

## **XENOBIOTICS TRANSFER VEHICLES\*THEIR PRODUCTION AND USE**

**Patent number:** JP55013260  
**Publication date:** 1980-01-30  
**Inventor:** BARII SHIAAZU; DEBITSUDO UEIN IESUEAA  
**Applicant:** LITTLE INC A  
**Classification:**  
- **international:** **A61K9/127; A61K9/127;** (IPC1-7): A61K9/10; A61K9/50  
- **europaen:** A61K9/127B; A61K9/127P  
**Application number:** JP19790044477 19790413  
**Priority number(s):** US19780896311 19780414

### **Also published as:**



GB2018712 (A)  
FR2422396 (A1)  
DE2915028 (A1)  
CH637825 (A5)  
IT1193471 (B)

Abstract not available for JP55013260

Abstract of corresponding document: **GB2018712**

A delivery vehicle, suitable for delivering and releasing a xenobiotic to a mammalian host, to beneficially alter the pharmacodynamics (e.g. plasma kinetics, chemotherapeutic effectiveness, toxicity, oral absorption, tissue distribution, metabolism and the like) of the xenobiotic, is in the form of microreservoirs formed of a phospholipid constituent and a phospholipid-immiscible constituent. Xenobiotic binding agents and release agents may be added.

---

**BEST AVAILABLE COPY**

⑬ 日本国特許庁 (JP)  
⑭ 公開特許公報 (A)

⑮ 特許出願公開  
昭55-13260

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 9/10  
9/50

識別記号

庁内整理番号  
7057-4C  
7057-4C

⑰ 公開 昭和55年(1980)1月30日

発明の数 3  
審査請求 未請求

(全 35 頁)

⑱ 異種生物質送達賦形薬、その生成法及び使用法

⑲ 特 願 昭54-44477  
⑳ 出 願 昭54(1979)4月13日  
優先権主張 ㉑ 1978年4月14日 ㉒ 米国(US)  
㉓ 896311

㉔ 発 明 者 バリー・シアーズ  
アメリカ合衆国マサチューセツ  
州01945マーブルヘッド・クリ  
ーブランドロード5

㉕ 発 明 者 デビッド・ウエイン・イエスエ  
アー  
アメリカ合衆国マサチューセツ  
州01922ニューバリー・ジョン  
ソンレイン6  
㉖ 出 願 人 アーサー・デー・リトル・イ  
ンコーポレーテッド  
アメリカ合衆国マサチューセツ  
州02140ケンブリッジ・アコー  
ンパーク25

㉗ 代 理 人 弁理士 小田島平吉

明 細 書

1. 【発明の名称】

異種生物質送達賦形薬、その生成法及び使用法

2. 【特許請求の範囲】

1. 異種生物質を含有するミクロ貯蔵器の形態にあり、該ミクロ貯蔵器は脂質成分および生体学的に適合する媒体中で安定であり且つそれと本質的に不混和性である脂質-不混和性脂質成分から成ることを特徴とする、その使用によつて薬力因子を有利に収容せしめる該異種生物質を哺乳類の体内に送達および解放せしめるための、該装置と生体適合する送達賦形薬。

2. 該ミクロ貯蔵器は約100Å乃至約800Åの範囲の直径を有する小胞状形態にあるか、約250Å乃至1000Åの範囲の直径を有する非小胞状形態にあるか、又は非小胞状および小胞状の両形態にある、特許請求の範囲第1項記載の送

達賦形薬。

3. 該ミクロ貯蔵器は約50モル%乃至約90モル%の該脂質成分を含有する、特許請求の範囲第1項記載の送達賦形薬。

4. 該ミクロ貯蔵器は異種生物質適合調節剤又は異種生物質解放促進剤を含み、特許請求の範囲第1項記載の送達賦形薬。

5. 該脂質成分はホスファチジルコリンを含有して成り且つ少なくとも約5モル%に相当する量でホスファチド酸を含有してもよい、特許請求の範囲第1項記載の送達賦形薬。

6. 該脂質不混和性脂質成分は10~18炭素原子を有する脂肪酸のコレステロールエステル又はトリグリセライドより成る、特許請求の範囲第1項記載の送達賦形薬。

7. 該異種生物質は薬化学療法剤、寄生虫駆除剤、又は受精率調節剤の如き薬剤である特許請求

の製造法：1項記載の迅速成形法。

8. 該具生生物質はその血液動力学特性、化学療法的有効性、又はその経口吸収を有利に改変される薬剤である、特許請求の範囲第1項記載の迅速成形法。

9. 脂質成分と生理学的に適合する液体中で安定であり且つ本質的にそれと不混和性である磷脂質不混和性脂質成分とから成る組成物のミクロ貯蔵物を形成せしめ；且つ遮断せしめるべき該具生生物質を該ミクロ貯蔵物内に導入せしめる段階から成ることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の迅速成形法の形成方法。

10. 該ミクロ貯蔵物を形成せしめるための該段階は、

(a) 溶剤を用いて該脂質成分及び該具生生物質不混和性脂質成分の溶液を生成せしめ；

(b) 該溶剤を除去することによつて該脂質

12. かくして形成せしめた該ミクロ貯蔵物を分離するための該段階は、超音波処理した該溶液を离心分離し且つ該离心分離により生ずる透明相をクロマトグラフィーにかけることによつて一定のクロマトグラフィー画分を得、そして場合により約190Å乃至800Åの範囲の直径を有する小粒状形態にある該ミクロ貯蔵物を含有する該クロマトグラフィー画分を、約250Å乃至約1000Åの範囲の直径を有する非小粒状形態にある該ミクロ貯蔵物を含有する画分から分離する段階を更に包含する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

13. 該溶液に該具生生物質結合剤又は該具生生物質溶解促進剤を添加する段階を包含する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

14. 該生理学的に適合性液体中に該具生生物質を含有する該ミクロ貯蔵物を溶解させ、それにより該液体中の該具生生物質を得るか、又は

特開55-13260(2)

成分と該脂質不混和性脂質成分の乾燥混合物を生ぜしめ；

(c) 該乾燥混合物を生理学的に適合する液体を用いて水和せしめることによつて該溶液を形成せしめ；

(d) 該溶液を非酸化性雰囲気下に少なくとも該脂質不混和性脂質成分の温度に等しい温度において超音波処理することによつて該ミクロ貯蔵物を生成せしめ；且つ

(e) かくして形成せしめた該ミクロ貯蔵物を分離する、

ことから成る、特許請求の範囲第10項記載の方法。

11. 該ミクロ貯蔵物内に該具生生物質を導入せしめるための該段階は該具生生物質を段階(a)において該溶液に添加するか、該超音波処理前に、段階(d)の該溶液に添加することから成る、特許請求の範囲第10項記載の方法。

生理学的に許容し得る材料から形成されたカプセル中に該具生生物質を含有する該ミクロ貯蔵物をカプセル化するための工程を含む特許請求の範囲第9項記載の方法。

15. 脂質成分と生理学的に適合性の液体中で安定であり且つこれと本質的に不混和性である磷脂質不混和性脂質成分から形成されたミクロ貯蔵物内に含有された該具生生物質の経口投与、経口投与、局所投与又は吸入投与又は粘膜内、腔内、腔内又は皮下注入によつて哺乳動物中に導入する工程より成る哺乳動物宿主内に該具生生物質を送達及び解放する方法。

3. 【発明の詳細な説明】

本発明は哺乳動物宿主内の具生生物質 (xenobiotic) の送達と解放に関するものである。従って本発明は、本発明は、僅かするミクロ貯蔵物 (micro-reservoirs) の形態にある具生生物質迅速成形法

(vaccines)、ミクロ形成を形成させるための方法、および送達され、且つ解放される異種生物質の薬力学を予め決め且つ制御する、哺乳類宿主への異種生物質の送達方法に属するものである。

多くの異なる状況において且つ多くの異なる環境下に、哺乳類宿主に対して、その宿主には異種である薬力学的に活性な薬剤を導入することが望ましいが、これらの薬剤を以下においては「異種生物質」(xenobiotics)と呼ぶことにする。これらの異種生物質は、薬剤、診断剤、代謝産物、内因性(endogenous)生化学的化合物、ホルモン、免疫学的補助剤などを包含するが、しかしこれらに限定する必要はない。

何れの異種生物質の投与においても、ある程度の特異性が得られなくてはならず、且つ特異性は異種生物質を、その薬理的に有効な且つ制御可能な状態に到達させることを必要とする。それ故、多くの

学的化合物と適合しない異種生物質の溶解度、および異種生物質の代謝活性化を受けることができる。

従来の技術において、望ましい性質を有していることが認められた多くの異種生物質の特異性または薬力学を、有利に改良および制御することが望ましいということが認められている。薬剤の特異性を調節するための従来の方法は、通常外科的手法によつて、その薬剤を送達せしめるべき器官中またはその器官の近くに配置した、移植装置の使用を包含する。典型的には、これらの移植装置は、送達せしめるべき薬剤を含有する共有融合面材料を包含する。これらの面材料は水溶性(たとえば、カニガサジメチルセルロースまたはポリビニルアルコール)、水中膨潤性(たとえばヒドロゲルまたはセラテン)、脂水分解性重合体(たとえばポリ乳酸、ポリグリコー

特開昭55-13250(8)

異種生物質の応用に付随する特異性の欠如は、それらの使用により望まれる結果の達成における、それらの潜在的有効性の、ほとんど全部ではないまでも、かなりの部分を、それらの物質から奪い去る。たとえ、認められる量の薬剤が橋の組織に到達するのに十分な時間にとたつて血漿によつて保持されることができない化学療法剤、または血行が予定されているが、しかし胃腸管を通り抜けることができない経口投与した薬剤は、それを病変に有効ならしめることができる程度の特異性を欠いている。かくして、望ましい特異性を欠いている場合には、異種生物質は、その完全な潜在活性(potential)を表現するために所望される薬力学を全く喪失しないか、または限られた程度に改変することができるに過ぎない。このような薬力学としては、血漿薬力学、組織分布、滞留の程度、生体内の治療剤の水準、常態で他の薬

剤またはポリ-α-アミノ酸、あるいは非加水分解性重合体(たとえば有価ポリシロキサンゴム)であることができる。一般に、これらの移植装置は、拡散または水分分解によつて、それらが含まする薬剤を送達することができる速度を制御することができるけれども、解放せしめる薬剤の薬力学の変更は、たとえ可能であつたとしても、きわめて僅かであるに過ぎない。

異種生物質の薬力学の変更および制御のために提案された、更に最近の方法は、異種生物質を投与せしめる宿主内の作用の場所において異種生物質を送達し且つ制御可能なように解放することのできる担体の使用である。そのための担体としてリボソームの使用が提案されている(Gregoriadis, G., "Biochemistry and Medicine of the Ribosome", 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1968, p. 100).

*Carrier Potential of liposomes in Biology and Medicine* <sup>9</sup>, *The New England Journal of Medicine*, 第295巻, 18号, 704~710頁, 1976年9月26日および11号, 765~769頁, 1976年9月30日参照)。これらの提案の方法によるリボゾームは、磷脂質、特に、たとえばコレステロール、磷脂シセテム、ステアリルアミンおよびホスファチジルコリンが始めに混和する、たとえば、ホスファチジルセリンのようなその他の磷脂質と組合せられた、ホスファチジルコリンから本質的に成っている。リボゾームは液体成分との混和性によつて特徴的であつて、この多量は、かかる成分間ほとんどまたは全く混和性が存在しないことを意味する。その上、これらの固体は、特に小さな粒径、たとえば約850Åの粒径まで超微分散した場合には、正として磷脂質成分の酸化および/またはそれらの

およびウイルス感染の予防において、および生物学的増殖の研究において、各種生物質によつて果たされる役割が次第に増大しつつあることから、改良した組体に対する要請もまた、増大しつつある。それ故、このような改良した送達系が望ましいことは明白である。

かくして、本発明の主要目的は宿主系統内で循環することができるミクロ分散物の形態にある改良した異種生物質送達系を提供することにある。この目的は、親水性、親油性または両親水性と疎水性化合物の組合せを包含する広い範囲の異種生物質と適合し且つ通常で宿主系統と生適合する、上記の改良した異種生物質送達系を提供することにある。本発明のもう一つの目的は、送達系にわたる形成中、且つまた宿主系統内での使用中に安定であり且つ経口、静脈内、筋肉内、硬膜内、皮下、局所的および吸入を包含する、い

特開昭55-132604)  
 然不安定性のために、経口の安定性を欠いている。その上、磷脂シセテム、ホスファチジルセリンまたはその他の負電荷を有する成分の存在のために負電荷を有しているこれらのリボゾームは、8価の陽イオンの存在で凝集する。従って、リボゾームを静脈内に注射するときは、少なくとも部分的にそれらの大きなが大でうるために、肝臓および脾臓中で優先的に凝集される。かくして、従来の方法によるリボゾーム剤は、多数の副作用と毒性を有する且つ哺乳動物系統と生適合性(biocompatible)であるけれども、それらの固有の不安定性、著しい凝集傾向および比較的大きな粒径が、完全しうる薬用送達系として働くためのそれらの能力を低下させている。

酒、糖尿病、関節炎、遺伝的代謝障害、金属貯蔵病(metal-storage diseases)などの治療において、たとえばアブラマのような疾病か

ろいろな投与方法に適合する異種生物質送達系を提供することにある。

本発明の別の目的は、宿主系統内に送達し且つ所望せしめる異種生物質を予め決められた且つ有利に改変し且つ制御することができる異種生物質送達系を提供することにある。このようにして有利に改変し且つ制御する能力としては、血漿動力学、組織分布、毒性、経口吸収、化学活性、代謝などがある。

本発明の別の主要目的は、哺乳動物系統内で循環することができる、それによつて異種生物質の薬力学に与える予め決められた有利な改変を達成することにより予定の場所に異種生物質を送達することができる、ミクロ分散物の形態にある、異種生物質送達系を提供することにある。

本発明の更に他の主要目的は、哺乳動物系統内において異種生物質の薬学的に有効な量を、送達

場所上である程度予め決めることができる時間を  
を行なうよりな場合に、迅速且つ解放し、かく  
して異種生物質の有効性を増進するための方法を  
提供することにある。

本発明のその他の目的は、部分的に在在明であり  
且つ部分的には、以下の説明によつて明白とな  
るであろう。

本発明の1局面において、哺乳類宿主として生  
活を送るにつて、その作用によつて異種生物質の  
有効性を有利に改良することができる、異種生物  
質を宿主内に送達し且つ解放するための送達系形  
態を提供するが、この送達系形態は、異種生物質  
を含有するミクロ貯蔵器の形態であり、このミク  
ロ貯蔵器は脂質成分および生理学的に適合する  
液体中で安定で且つ本能的にそれと混和しない脂  
質不混和性脂質成分から成つてゐることを特徴  
とする。

解放するための方法を提供する。

本発明のな別の局面においては、脂質成分  
および生理学的に適合する液体中で安定である且  
つそれと本能的に混和しない脂質不混和性脂質成  
分から成る、循環するミクロ貯蔵器から宿主内に  
異種生物質を解放するという装置から成る、異  
種生物質を哺乳類宿主内に送達するための薬力学  
を予め決め且つ制御する方法を提供する。

それ故、本発明は、いくつかの段階および以  
上のかかる段階の相互間の関係、ならびに以下の  
詳細な説明において例示する、特徴、性質および  
成分間の関係を有する組成物ならびに薬品から成  
つてゐる。

本発明の本質および目的のより完全な理解の大  
めには、図面と関連して示す以下の詳細な説明を  
参照すべきである。

本発明の異種生物質送達系形態は、本発明に混

特開昭55-13280(5)

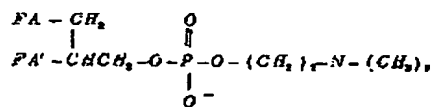
本発明の別の局面においては、脂質成分およ  
び生理学的に適合する液体中で安定であり且つそ  
れと本能的に混和しない脂質不混和性脂質成分  
のミクロ貯蔵器を形成せしめ、そして送達せしめ  
るべき異種生物質をミクロ貯蔵器内に輸入する  
(incorporation) という段階から成る、異種生物  
質の薬力学を予め決めることができるように試化  
させ且つ制御することができる、哺乳類宿主内に  
異種生物質を送達するための、異種生物質送達系  
形態を形成するための方法を提供する。

本発明の更に他の局面においては、生理学的に  
適合する液体中に保持され且つ脂質成分および  
生理学的に適合する液体中で安定であり且つそれ  
と本能的に混和しない脂質不混和性脂質から成  
るミクロ貯蔵器内に含有せしめた、医薬的に有効  
な異種生物質を哺乳類宿主内に導入する段階か  
ら成る、異種生物質を哺乳類宿主内に送達し且つ

和しない2種以上の脂質の混合物から成つてゐる。  
更に詳細には、送達系は、脂質成分とコレステ  
ロールエステルまたはトリグリセリド、あるいは  
コレステロールエステル類の混合物またはトリグ  
リセリド類の混合物、あるいはこれらの成分の  
混合物であることができる脂質不混和性成分と  
から成る組成物から形成せしめる。脂質成分は  
1種より多くの脂質から成つていてもよく、且  
つミクロ貯蔵器組成物は結合調節および/または  
解放速度調節成分をも含有することができる。本  
発明の実施例に対して通ずる脂質類の例は、ホス  
ファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホス  
ファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノ  
ールアミン、ホスファチド酸およびスフィンゴマ  
イシンである。これらの脂質類の2種以上の  
混合物を用いることもできる。これらの中、単酸  
で、または他の脂質類との混合物としてのホスフ

アサジルコリンが好適である。

ホスファチジルコリンは、グリセロ磷脂およびコリンと脂肪酸類とのエステルである化合物に対して適用する術路である。かくしてホスファチジルコリンは下式によつて表わすことができる：



上式でFAおよびFA'は脂肪酸残基である。これらのエステルを形成せしめるために用いる脂肪酸は、飽和または不飽和であることができ且つ約12〜18炭素原子を有することができる。このような脂肪酸は、限定するものではないが、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸などを包含する。本発明の薬剤送達賦形剤中で用いるホスファチジルコリンは、リットマン (Lisman, *Biochemistry*, 18: 2548 (1978))

質を用いることができるということをも、了解すべきである。

送達賦形剤の成分として使用するコレステロールエステルまたはトリグリセリド成分は、磷脂質成分と本質的に混和せず且つまた、たとえばNaClまたはKClを含有する生理学的に平衡した塩溶液のような生理学的に適合する媒体によつて代表されるような水性の環境で、本質的に不活性でなければならぬ。コレステロールエステルまたはトリグリセリド成分は、単分子層を形成することがない偏置性両電性または非電性でなければならず且つ磷脂質分子層中に本質的に混和しないような環境で存在していなければならない。

コレステロール、 $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{OH}$ 、は、たとえばオレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸などのような飽和および不飽和脂肪酸の両方と共に容易にエステルを形成する。1不飽和、第2アルコール

特開昭55-13260(向)

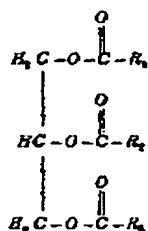
が記している方法によつて、卵の黄味から、またはたとえば大豆のような他の天然源から、単離することができる。あるいは、たとえばローゼルス (Roblee および Vanderberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 187: 580 (1969)) に記すような適当な方法によつて、合成することができる。

以下の本発明の詳細な説明においては、送達賦形剤中の磷脂質成分を、便宜上、ホスファチジルコリンによつて例証するが、この磷脂は、上記の一般式内に入るエステルを包含するものとする。ある種のミクロ肝臓器混合物においては、比較的少量のホスファチド酸を磷脂質成分中に納入せしめるとによつて、ミクロ肝臓器への異種生西薬の割合を向上させることができる。ホスファチジルコリンの代りに、膜の化学的および物理的性質に合致する、前記のものを含む；その他の磷脂

である。一般に、10〜18炭素原子を有する脂肪酸が好適である。これらのコレステロールエステルを生成せしめるための適当な手段は、脂肪酸クロリドとコレステロールの割合および天然源からの分離を包含する。

コレステロールエステルを形成させるための脂肪酸の選択においては、僅かな程度の不飽和（たとえば脂肪酸当り約2以下の二重結合）を有するものであることが好適である。一般に、比較的高度の混和性を有する脂肪酸から成るエステルは、高度に不飽和な脂肪酸から成るものよりも、大きな安定性を有する両電性西薬送達複合体 (comp-*plexes*) を形成する。

本発明の実施に対して適するトリグリセリドは、下記一般式を有するグリセリンの脂肪酸エステルであり、



上式中でエステルを形成する脂肪酸の  $R_1$ 、 $R_2$ 、および  $R_3$  は、10～18 炭素原子を有することができる。このような脂肪酸の例は、パルミチン酸、ステアリン酸、ミリスチン酸、オレイン酸およびリノール酸である。これらのトリグリセリドは、脂肪酸クロリドとグリセリンの混合により製造することが便利である。これらは天然源から単離することもまた可能である。

以下の一般的な説明においては、便宜のために、コレステロールエステルを用いるものとする。いうまでもなく、ミクロ貯蔵器送液装置の生成に

ステロールエステルに対する比は、これらの形態の中のどちらが当該合成手順において優勢であるかを決定する。これらの形態の間の選択は、三として選定し且つ解放せしめるべき異種生物質の本質、所望する異種生物質の分子量および投与の方法に依存する。

ミクロ貯蔵器を形成させるための異なる合成法を、その中への異種生物質の導入と共に、第1および第2図に概念的に示すが、ミクロ貯蔵器を形成せしめるために超音波処理を使用する第3図に示す連絡が、好適方法を抜く。この方法においては、ホスファチジルコリンとコレステロールエステルを、これらの両成分に対する溶剤である不活性有機液体、たとえばクロロホルム、中で混合し、且つ所望するならば、異種生物質を、第1図中の順序によつて示すように、この溶液に加入する。次いで溶液を真空下の蒸餾によつて除去し、

特開昭55-13260(7)

においては、トリグリセリド、コレステロールエステル類の混合物、トリグリセリド類の混合物または1種以上のコレステロールエステルと1種以上のトリグリセリドの混合物をも採用することができるということを了解すべきである。

異種生物質不活性成分としてコレステロールエステルまたはトリグリセリドの何れかを使用している実施例を提供する。

本発明の異種生物質送液装置は、以下において「ミクロ貯蔵器」と呼ぶものの形態にある。これらのミクロ貯蔵器は、2形態の中の一つ、すなわち、ミクロ貯蔵器の製造において使用する媒体を含有する小さな腔で任意的にキザビタイを有する小腔形態、または異種生物質分子層内に含有されたコレステロールエステルおよび/またはトリグリセリドを有する微小腔形態をとることができ、後者のように、ホスファチジルコリンのコレ

ステロールエステルに対する比は、これらの形態の中のどちらが当該合成手順において優勢であるかを決定する。これらの形態の間の選択は、三として選定し且つ解放せしめるべき異種生物質の本質、所望する異種生物質の分子量および投与の方法に依存する。

ミクロ貯蔵器を形成させるための異なる合成法を、その中への異種生物質の導入と共に、第1および第2図に概念的に示すが、ミクロ貯蔵器を形成せしめるために超音波処理を使用する第3図に示す連絡が、好適方法を抜く。この方法においては、ホスファチジルコリンとコレステロールエステルを、これらの両成分に対する溶剤である不活性有機液体、たとえばクロロホルム、中で混合し、且つ所望するならば、異種生物質を、第1図中の順序によつて示すように、この溶液に加入する。次いで溶液を真空下の蒸餾によつて除去し、

残留する乾燥炭酸塩混合物を、次いで、たとえば適当な濃度の  $\text{NaCl}$  または  $\text{KCl}$  および緩衝剤の水溶液のようを、生理学的に適合する液体の液相によつて、水和させる。初期混合物中に異種生物質を加えない場合は、ミクロ貯蔵器の完成以前に、生ずる液体混合物中にそれを加える。

液体混合物の生成においては、生理学的に適合する液体の約1乃至約5重量%に相当する量の乾燥混合物を使用することが好ましい。磷脂質/コレステロールエステル（またはトリグリセリド）組成物に加える異種生物質の量は変えることができるけれども、ミクロ貯蔵器中には異種生物質の約5パーセントに至るまでの異種生物質を導入せしめることが好ましい。

第1図に示すように、次いで非酸化溶剤、たとえば塩素系溶剤下に、塩水溶液を超音波処理することによつて、ミクロ貯蔵器を生産せしめる。



脂質組成を、磷脂質・不飽和性成分として働くコレステロールエステルとトリグリセリドの融点と等しい温度またはそれよりも遙かに高い温度で行なう場合に、ミクロ貯蔵器のより完全な生成が生ずるということが、認められている。脂質組成は、通常の動力水準で、所望されるミクロ貯蔵器の大きさを与えるべき時間行なう。たとえば、20分間の120ワットの電力が、充分であることが認められている。燃焼物質の脂質組成の代りとして、それを小さなナリフイスを通して押出すことによつて、ミクロ貯蔵器を形成せしめることができる。

第8図からわかるように、水性の媒体、たとえば塩溶液中におけるミクロ貯蔵器の生成のための別の経路は、水と非水性の有機溶剤を用いる磷脂質、コレステロールエステルおよび異性生物質の溶液の形成および引続くこの溶液の生理学的塩水

モル比によつて決定される。ミクロ貯蔵器の例としてホスファチジルコリンとコレステロールオレエートを用いる場合には、約5%〜8%モル%のホスファチジルコリンの使用は優先的に小粒状のミクロ貯蔵器を与え、一方、約50%モル%を超えるコレステロールエステルの使用は優先的に非小粒状ミクロ貯蔵器を与える。

本発明のミクロ貯蔵器は、磷脂質成分および本質的に磷脂質と混和しない脂質成分（コレステロールエステル、トリグリセリドまたはそれらの混合物）の混合物の使用によつて、独特の構造的特質を有している。この構造は、その小粒状および非小粒状形態において、第8および4図に概念的に示される。磷脂質（第8および4図中でホスファチジルコリンによつて表わされる）および不飽和性の脂質成分（コレステロールエステルによつて表わされる）の両者の不飽和性は、不飽和性の

特開55-13260 図  
溶液中への導入である。別法として、長直性油質を、注入或貯の前に、塩溶液中に加えてもよい。この方法の例は、流拌または液中への脂質成分のエタノール溶液の注入；または水性区画中への脂質混合物のエタノール溶液の緩徐な注入である。

水性の溶液媒体中のミクロ貯蔵器の生成の結果として生ずるくもつた媒体を、次いで遠心分離することによつて、透明相と上方のくもつた相を与えると、前者は、たとえば約800Å乃至1000Åの直径の、比較的大きな非小粒状ミクロ貯蔵器を含有する。透明相をクロマトグラフィーにかけることによつて、小さな（直径約250Å）非小粒状ミクロ貯蔵器と約100Å乃至約300Åの直径を有する小粒状のミクロ貯蔵器の画分が得られる。

小粒状および非小粒状形態の間のミクロ貯蔵器の分布は、磷脂質の磷脂質不飽和性成分に対する

脂質と水性の環境の間の接触を回避または最低限度まで低下せしめる組織化した（organized）ミクロ貯蔵器構造を生じさせる。この組織化は、一方において、前記のグレゴリアスによる従来の方法に従つて形成せしめられた脂質相によつて達成されるよりも大きな安定性を、ミクロ貯蔵器に対して付与する。これは一方における第8および4図を、他方における第5図と比較することによつて、示すことができるが、第5図はグレゴリアスの系列送達系の構造を概念的に示している。第5図から、リボゾームを形成せしめるために非水性の脂質を使用する場合に、層状の構造が生じて、明らかに層状の組織を不安定化する磷脂質の酸化のために、あるいは、脂質が磷脂質の転移速度よりも低下する場合は、その結晶化のために、不安定な組織を与える。

第8および4図に示す本発明のミクロ貯蔵器の

安定構造は、少なくとも部分的に、コレステロールエステルまたはトリグリセリドが水性の雰囲気中暴露されるのを防ぐ熱力学的推進力に帰せしめることができる。その結果として、本発明のミクロ貯蔵器の構造的全性 (structural integrity) が著しく増大する。これは、一方において、ミクロ貯蔵器中に導入した異種生物質の熱力学を調節し且つ変化させるためのミクロ貯蔵器の存在能力が、他の送達系と比較して、向上していることを意味する。その上、コレステロールなどの代りにコレステロールエステルまたはトリグリセリドを用いる効果である、ミクロ貯蔵器の漏洩性は、本発明のミクロ貯蔵器の漏洩を防止する。いうまでもなくこのような効果は、その結果としての系の自由エネルギーの大きさを低下と共に、コレステロールエステルまたはトリグリセリドを水性の環境中に放出するであろうから、この漏洩の防止は、

8.0の経漏率)を加え、生成する透過液を減圧乾燥下で81℃において120ワットで15分間超音波処理した。次いで各懸濁液を100.000gで1時間遠心分離することによつて、分散しない脂質を除去した。

遠心分離物の厚膜クロマトグラフィーは、ホスファチジルコリンまたはアドリアマイシンの分解の挙動を全く示さなかった。次いで各試料の4.0μlの部分濃本をふた付きのセル中に入れて、各試料を89℃でインキュベートした。個々の時点において、同溶液の光密度を、400nmと600nmで測定した。かくして倍率データを、これらの光密度の比、 $A_{400}/A_{600}$ 、と時間の関係として、第6図中にプロットする。両標識物は最初に本質的に同一の分子の大きさを有していたから、 $A_{400}/A_{600}$ の比は、リボソームの凍結組織の崩壊による粒子の大きさの増大の表

特開昭55-13260(9)

いうまでもなく、きわめて遅ましいことである。かくして、多くの点が自然に存在する脂質血清脂質蛋白質と類似する個々のミクロ貯蔵器は、それを導入せしめた哺乳類宿主の血漿中で循環させるため且つ血漿中で最高の有効性を維持するために、特に良く適応している。

従来の方法において提案されたリボソームと比較して、本発明のミクロ貯蔵器の著しく向上した試験管内安定性を、実施例1と第8図において例証する。

#### 実施例 1

60μmolの卵黄ホスファチジルコリン、異なる量のコレステリルオレエートおよび4μmolのアドリアマイシンからなる種々の混合物を、これらのミクロ貯蔵器成分のクロロホルム溶液から、真空中に乾固させた。生ずる投量に5μlの0.1M KClと10mgのトリヒドロキシメチルアミン (pH

示となる。

第8図は、本発明のミクロ貯蔵器と同様な大きさのリボソームの間の安定性の大きさを相対的に示している。88%のコレステリルオレエート、ならびに、それよりも少ない量のコレステロールエステルを含むミクロ貯蔵器の吸光度は比較的安定であるのに対して、リボソームの吸光度は時間の開始時から急激に増大し、10日間の経過後にはリボソームは、あらゆる実際的使用に耐えないほどに劣化した。先に述べたように、リボソームの劣化は、水性の環境との相互作用およびより大きな粒子への凝集によるものと考えられるが、ミクロ貯蔵器においては、その構造的全性 (structural integrity) と漏洩性によつて、これらの3要因が存在しない。

試験管内安定性に取って、本発明のミクロ貯蔵器は、リボソームよりも著しく向上した生体内安

定値をも有している。これを実施例 8 と第 7 図に示す。

#### 実施例 8

100 μモルの卵黄ホスファチジルコリン、10 μモルの<sup>14</sup>C-標識されたコレステリルオレエートおよび15 μモルの卵黄ホスファチド酸をクロロホルム中に溶解し、その溶液を真空下に蒸発乾燥した。乾燥した混合乾燥物を5 mlの0.1 M NaClと10 mMのトリヒドロキシメチルアミン (pH 8.0) を加えた。生ずる懸濁液を遠心分離機で5分間5000 rpmで15分間超音波処理した。超音波処理した混合物を、2.5 × 4.0 cmのセファロース 4Bカラム上でクロマトグラフィーにかけた。卵黄とコレステリルオレエートの溶出順序と一致を示した各画分を集めて、紫外線によって検出した。これらの検出したミクロ貯蔵器11個を、12針の針の針座中に注射した。種々の時間と血

実施例 8 と第 8 図に示す。

#### 実施例 9

2188 μモルの卵黄ホスファチジルコリン、248 μモルの<sup>14</sup>C-標識されたコレステリルオレエート (比放射能  $1.6 \times 10^4$  滅滅/分 (dpm) /μモル) および80 mgのアドリアマイシンをクロロホルム中で混合し、その溶液を真空下に蒸発乾燥した。次いで、混合した乾燥物を、110 mlの0.1 M NaClと10 mMのトリヒドロキシメチルアミン (pH 8.0) の溶液によって水和した。次いでこの懸濁液をブタンソル-185超音波処理機 (ソニファ) を用いて、遠心分離機で5分間5000 rpmで15分間超音波処理した。

超音波処理した液体を、次いで2.5 × 4.0 cmのセファロース 4Bカラム上でクロマトグラフィーにかけた。クロマトグラフィーから得た各画分を、ゴメリ (Gomori, J. Lab. Clin. Med., 27,

特開355-13260(10)

試料を採取して、その中に含まれるミクロ貯蔵器に等なり放射能を測定した。かくして得たデータを、注射後の時間の函数として、第7図にプロットする。

動力率は恒常であるけれども、第7図から、平衡において、ミクロ貯蔵器のステラランスは50時間の半減値を有していることがわかる。それに対して、同様な負荷を有する超音波処理リボソームは、僅か8分の血液中濃度を有するにすぎない (ジュリアーノ (R. L. Juliano) およびデュー・スランプ (D. Stamp), Biochem. Biophys. Res. Comm. 55, 651 (1975))。ミクロ貯蔵器によって達成される、ほぼ40倍に近い寿命の増大は、向上した機能的安定性によるものであると仮定することが論理的であると思われる。

ミクロ貯蔵器中に導入した異種生物質の含有を

858 (1941) の方法によりホスファチジルコリン含量について、放射能によりコレステリルオレエートについて、また紫外線によってアドリアマイシンについてそれぞれ測定した。これらの分析結果を、コレステリルオレエート、ホスファチジルコリンおよびアドリアマイシンに対する結果を重ねて、第8図にプロットする。

小図のミクロ貯蔵器の直径は、卵黄ホスファチジルコリンの超音波処理リボソームを用いて予め校正してあるゲルカラム上の溶出順序によって決定して、約200 Å ~ 500 Åであることが認められた。

第8図から、ホスファチジルコリン (病態分析によってモニターした)、コレステリルオレエート (放射能によってモニターした) およびアドリアマイシン (紫外線によってモニターした) の溶出順序が一致していることが認められ、これは異

種生物質（アドリアマイシン）が小胞状のミクロ貯蔵器と結合しているものである。アドリアマイシンは、多少の水溶性の特性を併せ、比較的親水性の薬剤であるから、この薬剤の局在の場所は、ミクロ貯蔵器の脂質組織内であると推定することが妥当である。

具種生物質を一層効果的にならしめるように変化させることができる具種生物質の薬力学の中には、血漿薬力学、毒性の増進および治療剤としての有効性がある。アドリアマイシンは、効力の大きい癌の化学療法剤の一つであると考えられるが、これは比較的親水性であり且つ投与後2分以内にその約5%が血漿から去っていくという特徴を持ってしまい、残存して腫瘍組織、すなわち癌腫、に到達するのは5%程度にすぎないという特徴によって明らかをように、血漿中で保持することがわかって困難である。このことは、腫瘍内に注

シメタルアミン（pH 7.4）を加えた。次いで、この水性の懸濁液を遠心分離器で51℃において15分間超音波処理した。生成する小胞状のミクロ貯蔵器内に含有されたアドリアマイシンをミクロ貯蔵器から、 $2.5 \times 20 \text{ cm}$  セファデックス G-50 ゲルカラムの通過によって、分離した。ミクロ貯蔵器中に導入されたアドリアマイシンを含有する懸濁液は8マブアドリアマイシン/mlに濃縮された。

同じ濃度において且つ同一緩衝液中で遊離アドリアマイシンの対照試料でも調製した。

8匹のねずみに、アドリアマイシンを含有するミクロ貯蔵器を静脈注射し、一方、8匹のねずみに、遊離のアドリアマイシンを静脈注射した。ミクロ貯蔵器内に含まれるアドリアマイシンの投与量は4mg/kgであり、遊離のアドリアマイシンに対しては、8匹のねずみにおいて4mg/kg、他

特開55-13260(11)

射したもののアドリアマイシンの分布と時間の関係を示す図3図に示されている。最後に、アドリアマイシンは、特に心臓組織中に集中する傾向があるために、毒性であることが知られているから、その投与を注意深くモニターするのみでなく、きわめて低い投与量水準で、それを投与しなければならぬ。

以下の実施例4〜6および第10〜12図は、血漿中で循環してアドリアマイシンの血漿薬力学、毒性および化学療法剤としての有効性を変化させるための、ミクロ貯蔵器の能力を調製する。

#### 実施例 4

200  $\mu$ モルの卵黄ホスファチジルコリン、28  $\mu$ モルのコレステリルオレエートおよび4mgのアドリアマイシンをクロロホルム中に溶解したのち、真空中に乾燥させた。生ずる乾燥残渣は8mlの0.15 M NaClと10mgのトリヒドロキ

の8匹のねずみにおいて10mg/kgであつた。0.5mlの血液を各ねずみから確々の時点で採取した。血液試料から血漿試料を分離して、蛍光増光(fasing fluorescence)によりアドリアマイシンの定量を行なつた。かくして得たデータを、注射後の時間の関数として、図10表にプロットする。

第10図から、アドリアマイシンに対する迅速感測液としての循環ミクロ貯蔵器の使用は、薬剤に対する血漿薬力学を有利に改変し且つ改良することが明らかである。同一濃度水準を流す循環AとBの比較により、約15分後に、血漿中の循環するミクロ貯蔵器中におけるアドリアマイシンの量は約4  $\mu$ g/mlであるのに対して、血漿中の遊離のアドリアマイシンの濃度は約0.4  $\mu$ g/mlであることがわかる。それ故、この時点において、循環するミクロ貯蔵器によって運ばれる血漿中の

アドリアマイシンの投与は、この薬剤を直接に血液に導入したときよりもおよそ10倍も大であった。その上、第10回からわかるように、遊離のアドリアマイシンは、およそ324時間後に血液からほとんど消失するのに対して、循環するミクロ肝臓系中では、この時点において、約0.4  $\mu\text{g}$ /ccの濃度まで、なお存在していた。すなわち、324時間後に、循環するミクロ肝臓系中で遊ばれる血液中の薬剤の濃度は、遊離遊離の形態で導入した場合の速か18分後と同等であった。

次に、曲線Aと曲線C(10  $\mu\text{g}$ /ccの投与量に於ける遊離アドリアマイシン)の比較は、1時間後の血液中の薬剤の濃度が、循環するミクロ肝臓系によつて遊ばれる場合には約1.8  $\mu\text{g}$ /ccであり且つ遊離形態にある場合は約0.5  $\mu\text{g}$ /ccであり、また8時間後には、それぞれ、約0.21  $\mu\text{g}$ /ccと約0.14  $\mu\text{g}$ /ccとなることを示す。かく

特開55-13260(12)として、本発明の循環するミクロ肝臓系の使用は、同一薬剤をミクロ肝臓系により投与する場合の2.5倍大の投与量で遊離の形態で投与する場合に達成される濃度よりも、かなり低い濃度中におけるこの薬剤の濃度を提供することができる。

第10回に於けるように、アドリアマイシンのような薬剤の血液動力学的改変は、その薬剤が血液中に比較的低く保持され、かくして、たとえば肝臓、腎臓および心臓のような器官中での濃縮が防止される故に、低い毒性を有していることを意味する。またこれは、与えられた投与量において、血液中に残っている薬剤の量が多いほど、副作用の発生アドリアマイシンへの暴露がより多く行なわれるわけであるから、遊離形態で循環場合よりも循環するミクロ肝臓系によつて遊ばれる場合のほうが、より効果的であることを意味している。癌細胞を殺すためのこの薬剤の有効性は、

2字加入

癌細胞がこの薬剤を取り込む能力に依つていから、薬剤と細胞の間の最大の濃度が最大の有効性のために絶対に必須である。

遊離に、第10回に示すような異種生物種の血液動力学的改変は、たとえば曲線Cの10  $\mu\text{g}$ /ccの投与量の効果が化学療法に目的に対して有害なものとなすをすれば、この薬剤を循環するミクロ肝臓系により送達および解放せしめる場合に投与と水相を4  $\mu\text{g}$ /cc以下に低下させることができるということが明白であるから、投与量の減少の可能性を提供する。このような投与量の減少は毒性をも大きく低下させる。

循環するミクロ肝臓系の使用によつて達成されるアドリアマイシン濃度の新しい法則を、実施例5と第11回に示す。

#### 実施例5

100  $\mu\text{mol}$ の原料ホスファチルコリン、

100  $\mu\text{mol}$ のコレスチルコレエートおよび20  $\mu\text{mol}$ のアドリアマイシンをクロロホルム中に溶解し、その溶液を真空中で乾固させた。生成する乾燥残渣混合物に20  $\mu\text{mol}$ の0.1 M KClと10  $\mu\text{mol}$ のトリヒドロキシメチルアミン(pH 8.0)を加えた。水性の懸濁液を凍結溶剤(fic 5)にて15分間超音波処理した。超音波処理した液体を2.6  $\times$  4.0  $\text{cm}$ のセファロース4Bゲルカラム上でクロマトグラフィーにかけた。ホスファチルコリン、コレスチルコレエートおよびアドリアマイシンの溶出順序との一致を示す部分のみを集めた。これらの集めた部分を、X-M-50膜を使用する膜外系場によつて、1  $\mu\text{mol}$ 当り8  $\mu\text{mol}$ のアドリアマイシンの最終濃度まで濃縮した。

アドリアマイシンなしでミクロ肝臓系の類似の試料をも調製して、同じミクロ肝臓系に溶解した。0.1 M KClと10  $\mu\text{mol}$ のトリヒドロキシ

テルアミン中の8mg/匹の濃度の塩酸アドリアマイシンの希液をも、塩酸アドリアマイシンとして使用するための対照として、調製した。

アドリアマイシンを含有するミクロ貯蔵器、薬剤なしのミクロ貯蔵器および遊離の薬剤を、種々の薬剤投与量で、はつかねずみやに1回の腹腔内注射を用いて、注入した。各病態に対して10匹の8DF、はつかねずみを使用し、得られたデータを第11図にプロットする。これらのプロットは、時間の経過としてのはつかねずみの生存率を示す。ミクロ貯蔵器自体は、アドリアマイシンの存在において、何らの毒性をも示さない。すべての投与量水準において、アドリアマイシンを遊離するための保護するミクロ貯蔵器の使用は、遊離のアドリアマイシンが示す毒性と比較して薬剤の毒性作用を低下させた。投与量水準が低下するにつれて、遊離薬剤が毒性を低下させる能力は、

間にわたって注射した。対照として使用した1群のはつかねずみには、何かなる形態の薬剤をも与えなかった。各病態に対して5匹のはつかねずみを使用し且つ異なる2投与水準、4mg/匹および2mg/匹、を用いた。これらの試験から得たデータを、時間の経過としての生存率として、第12図にプロットする。

アドリアマイシンなしのミクロ貯蔵器を注射したはつかねずみは、プロット中の曲線Cで示す対照：はつかねずみと同様な生存率（プロットしていない）を有していた。4mg/匹の投与量水準においては、保護するミクロ貯蔵器によって遊離せしめるアドリアマイシンは化学治療効果を表わすのに対して、同じ投与量水準における遊離の薬剤は腫瘍細胞自体よりも劇的に大きな毒性を示した。2mg/匹という低い投与量水準において、保護するミクロ貯蔵器によって遊離せしめるアドリアマイシン

特開55-13260(13)

遊離の薬剤と比較して、いつそう顕著となる。この毒性の低下は、少なくとも部分的に、保護するミクロ貯蔵器がアドリアマイシンを血液中に保つて、組織および器官、特に心臓の外に保つことができる能力によつて、説明することができる。

本発明の遊離薬剤を用いるアドリアマイシンによる化学療法の効果を、実施例6と第12図に示す。

#### 実施例6

実施例6の手順に従つて、アドリアマイシンの存在および不在のもとで、小胞状のミクロ貯蔵器を調製し且つ遊離の薬剤として用いるためのアドリアマイシンをも培養した。多くのはつかねずみに、 $1 \times 10^5$  P388 腫瘍細胞を腹腔内に注射した。24時間後に、アドリアマイシンを含有する小胞状ミクロ貯蔵器と含有しないミクロ貯蔵器および遊離のアドリアマイシンを、腫瘍移植後5日

には遊離の薬剤よりも大きな化学治療効果を示した。

本発明のミクロ貯蔵器の配合においては、ミクロ貯蔵器の形成の際にそれによつて取り上げられる異種生物質の相対的な量を増大させるかまたは減少させるかどちらかが可能な、1種以上の異種生物質結合調節剤 (binding modifiers) を包含せしめることが望ましいことがあり得る。たとえば、ミクロ貯蔵器の磷脂質成分に加えた、比較的僅かなモルパーセント、すなわち約5モルパーセントまたはそれ以上、のホスファチド酸（電荷を有する物質）は、ミクロ貯蔵器に対する異種生物質の親和性を増大させることができることが見出された。それ故、ミクロ貯蔵器組成物の磷脂質成分を補正せしめるために1種以上の異なる磷脂質を使用することは本発明の範囲内である。その上、異種生物質の予定した取り上げを達成するために、

ミクロ貯蔵器の両断片を分として、単一の脂質質を溶ぶかまたは脂質質類の最適な組合わせを溶ぶかは、この改修分野の知識の範囲内にある。

両断片成分中に可溶であるかあるいはコレステロールエステルまたはトリグリセリド成分中に溶かに溶解するその他の脂質の包含によって、貯蔵器への脂質を油質の割合を調節することもまた、可能である。ミクロ貯蔵器/アドリアマイシン系において生成されるこの調節を、実施例7と第1に示す。また生成するミクロ貯蔵器の脂質生物活性または非活性に対してかかる調節が有している場合は、実施例8と818および14に例証する。

#### 実施例 7

10.5  $\mu$ モルの<sup>14</sup>C標識付付脂質ホスファテジルコリン（比放射能4180 dpm/ $\mu$ モルホスファテジルコリン）、12.6  $\mu$ モルのコレステリル

特開8355-13260(14)  
オレエート、または11.6  $\mu$ モルのトリオレイン（グリセリルトリオレエート）を含有するミクロ貯蔵器の一連の配合物を、11.6  $\mu$ モルのホスファテド酸によって代表されるような他の脂質を用い、または用いずに、且つ0~7.5  $\mu$ モルの量で存在する調節剤としてコレステロールを用い、または用いずに調製した。各配合物において、選定し且つ放出せしめるときは生物物質として、1.9  $\mu$ モルのアドリアマイシンを用いた。

配合物をクロロホルムの溶液として調製し、それを10ccのスクリーニャブガラス瓶中で数夜吸引して、乾固させた。次いで各配合物試料を8ccの0.154M NaClと10mMのトリヒドロキシメチルアミン（pH 7.5）を用いて水和させたのち、室温において成分間調節させた。次いで各試料を窒素気流中で濃縮を減して20分間超音波処理した。コレステリルオレエートを含有する

試料の超音波処理は51℃において、トリオレインを含有する試料は8℃において、行なつた。超音波処理後、各試料を早上速心分離機中で10分間速心分離することによって、すべてのナタン成分を除去した。

各試料を、抽出緩衝液として0.154M NaClと10mMのトリヒドロキシメチルアミンを使用し、2.6  $\times$  1.5cmのホスファテックスG-50カラム中を流下させた。ミクロ貯蔵器を含有する各G-50カラムの型減容量を求めて、<sup>14</sup>C脂質ホスファテジルコリン放射能について、且つまたアドリアマイシンからの蛍光について、分析した。 $\mu$ gアドリアマイシン/ $\mu$ モルホスファテジルコリンおよび $\mu$ gアドリアマイシン/ $\mu$ モル全脂質比としてのこれらの測定の結果ならびにミクロ貯蔵器によって上げられるアドリアマイシンの百分率を第1表中に示す。

これらの結果の記録においては、カプセル被覆したアドリアマイシン百分率は、1 $\mu$ モルの全脂質量当りに被覆量の被覆したアドリアマイシンを含有する試料に対して、標準化した。

## 第 1 表

ミクロ貯蔵器によるアドリアマイシンの取り上げに対する磷脂成分の組成および磷脂質組成と生体膜の組成の影響

試料番号	ミクロ貯蔵器組成, モル%					μg アドリアマイシン		カプセル液に溶けた %
	PC	GTO	CO	PA	Chol	PC μモル	PL μモル	
1	82	9	-	9	-	5.67	6.08	108
2	90	10	-	-	-	4.90	4.90	81
3	82	9	-	-	9	4.26	4.26	71
4	72	8	-	-	20	4.14	4.14	69
5	65	7	-	-	28	4.08	4.08	67
6	54	6	-	-	40	3.91	3.91	66
7	88	-	-	9	-	5.88	5.27	87
8	90	-	10	-	-	4.41	4.41	78
9	82	-	9	-	9	4.21	4.21	70
10	72	-	8	-	20	3.49	3.49	57
11	65	-	7	-	28	3.14	3.14	53
12	54	-	6	-	40	2.86	2.86	40

PC=ホスファチジルコリン      CO=コレステリルオレエート      Chol=コレステロール  
 GTO=グリセリントリオレエート      PA=ホスファチド酸      PL=全磷脂質 (PCおよびPA)

第1表中のデータから、磷脂質成分中の少量のホスファチド酸の割合（試料1および7）は、ミクロ貯蔵器によるアドリアマイシンの取り上げを増大させることがわかる。イミドカルブ（実施例18～15）と異なつて、アドリアマイシンは非荷基分子であり、このことは、磷脂質成分の一部としてのホスファチド酸の使用は、各成分の性質の異種生物膜に対して適用可能であるということを示唆する。

ミクロ貯蔵器組成物中のコレステロール、磷脂質組成と生体膜の組成は、アドリアマイシンのミクロ貯蔵器への結合を促進した。グリセリントリオレエートを含有するミクロ貯蔵器組成物へのコレステロールの添加（試料8～9）は、ミクロ貯蔵器組成物がコレステリルオレエートを含有する場合（試料9～12）におけるよりも、薬剤の結合に対する著しく低い作用を有していた。最後に、

第1表中のデータは、アドリアマイシンの場合には、コレステリルオレエート（試料7～12）の代りとしてのグリセリントリオレエート（試料1～6）の使用は、この異種生物膜のミクロ貯蔵器への結合を促進するということを示している。それ故、磷脂質成分および磷脂質不飽和性成分（付加的な異種生物膜結合調節剤を用い、または用いずに）の選択によつて、ミクロ貯蔵器中への異種生物質の取り上げ、またはそれへの結合の速度を、調節し且つ予め決めることが可能である。このような調節は、本発明の異種生物膜透過系における投与量、異種生物質解放の速度などに関して柔軟性を提供する。

ミクロ貯蔵器組成物によつて異種生物質の平衡割合が影響を受けるばかりでなく、異種生物質の放出すなわち解放速度もまた、この組成物によつて調節し且つ予め決めることができる。これは、



実例 8 に記載した図 18 および 19 図に示すように、非平衡状態に於けるミクロ貯蔵器からの代謝物生成速度の決定を可能とするモデルは必ずしも用いず、例証される。

#### 実 例 8

実例 7 に示すようにしてミクロ貯蔵器を組合せ、必要非平衡状態を確立するために、共通成分としてアドリアマイシンを含むミクロ貯蔵器と、適量速度をしない大規模の宿主ホスファチルコリン生成物と共にインキュベートした。これらの生成物は、約 1 μモルの宿主ホスファチルコリンを含む各種の組成のミクロ貯蔵器の混合を、1.0 ml の 0.15 M NaCl と 1.0 ml のトリヒドロキシメチルアミン (pH 7.8) 中の 9 μモルの共通成分処理宿主ホスファチルコリンに対して添加することによって、形成せしめた。比較別成分物は、ミクロ貯蔵器に

時間 55-13260(16)

よって運搬されるのではなくて、遊離の形態の同等の量のアドリアマイシンを含むように構成した。

アドリアマイシンの流出速度の測定については、かくして形成せしめた混合物の 1 種を各時刻に刻して使用した。指定の時間、試料を 15.000 ml において 2 分間遠心分離すると、この条件下、適量速度をしない成分物は、生ずる上澄液中に残留するミクロ貯蔵器から容易に分離した。アドリアマイシンは、ミクロ貯蔵器と共通成分生成物間で再平衡化する傾向があるから、平衡の速度は、ミクロ貯蔵器中に含有されるアドリアマイシンの流出速度の測定におけるミクロ貯蔵器生成物を形成する各成分の役割を評価するための動力学パラメーターとして用いることができる。

収得した上澄液の成分試料を蛍光について定量

し、かくして残存する蛍光の量を、混合液中に残存する量と比較した。それ故、上澄液中に残存するアドリアマイシンの量は、ミクロ貯蔵器中に含有されている成分の量を表わす。

この一連の測定から得たデータを図 18 および図 19 図にプロットするが、これらの図は、グリセリントリオレート (図 18 図) とコレステリルオレート (図 19 図) を含有するミクロ貯蔵器に対する時間の函数としての蛍光の減少を示している。

図 18 および 19 図にプロットするデータから、遊離のアドリアマイシンは上澄液から速く極めて急速に消失されるのに対して、ミクロ貯蔵器に結合したアドリアマイシンは速かに大きな程度に持続するということが明らかである。ミクロ貯蔵器の成分生成物における 9 μモルのホスファチルコリンの含有は、流出速度を大きく低下させるのに対し

て、コレステロールの結晶は、それを上昇させる。最後に、コレステロールエステルの代りにトリグリセリドを使用すると、流出速度が極度に低下する。

流出速度に基づくこれらの動力学的評価は、アドリアマイシンのミクロ貯蔵器への平衡結合に関する図 1 図のデータの意義性に貢献し且つこれらのデータは、ミクロ貯蔵器の形成を選択することによって、本発明の適用範囲を明確に示すべくミクロ貯蔵器に含まれる各種生物質の動力学を予め決め且つ調べる事ができるという事実を、確認する。

AD 8 は、化学療法において用いられるアドリアマイシンの高度に疎水性の類似体である。この薬剤は水性緩衝液中に全く不溶であるから、臨床的使用に連する AD 8 の溶液を形成せしめるためには、界面活性剤と有機液体を併用する必

要がある。現在用いられているこのような原料の1例は、エタノールと硫酸化エチレンジコロール界面活性剤（エマルホール）の等容量混合物である。

AD82の疎水性にかかわらず、本発明によつてそれをミクロ貯蔵液中に輸入せしめること、および、それによつて実施例8〜12および第15〜18図に示すように、血液動力学と血栓形成の両方に対してAD82の薬力学を有利に改良することが可能である。

#### 実施例 9

卵黄から抽出した1090  $\mu$ モルのホスファチジルコリン、121  $\mu$ モルの<sup>3</sup>H-標識付付コレステリルオレエート（190000 dpm/ $\mu$ モルの比放射能）および17.5  $\mu$ モルのAD82をクロロホルムに溶解し、次いで乾固させ且つ残渣を引いた。5.5 mlの0.25 M NaClと5 mlのトリ

しても、きわめて僅かな影響しか有していないことが認められた。このことは、実施例10と第18図から明らかである。

#### 実施例 10

104.6  $\mu$ モルの卵黄ホスファチジルコリンおよび11.6  $\mu$ モルの<sup>3</sup>H-標識付付グリセリントリオレエート（比放射能 $1.5 \times 10^5$  dpm/ $\mu$ モル）を含有する脂質的ミクロ貯蔵液配合を用いた。17.8  $\mu$ モルのAD82を加え、また1配合物においては11.6  $\mu$ モルの卵黄ホスファチド酸をも加えた。これらの混合物をクロロホルム溶液から乾固し、真空中に残渣を引いた。各試料に8 mlの0.15 M NaClと10 mlのトリヒドロキシメチルアミンを加え、その水溶液を遠心管底部下に80℃で20分間超音波処理した。各試料を25 × 20 cmのセファデックスG-50カラムを流下させ、生成する小胞状ミクロ貯蔵液の1  $\mu$ モルの

特開第55-13250(17)

ヒドロキシメチルアミン（pH 7.41）をこの乾固混合物に加えた。この液を48℃において遠心管底部下に超音波処理し、取得する超音波処理液を25 × 20 cmのセファデックス48カラム上でクロマトグラフィードにした。かくして得られた4の画分を、前記のようにして、ホスファチジルコリン含量、コレステリルオレエートおよびAD82について分析した。

抽出プロファイルを、各分析を直線合わせ、第18図にプロットする。このプロットから、AD82は非小胞状ミクロ貯蔵液（画分2〜5）と小胞状のミクロ貯蔵液（画分6〜18）の両者と結合している（associated）ことがわかる。

ミクロ貯蔵液組成物の脂質成分中における比較的少量のホスファチド酸の包含は、脂質質不混和性成分としてトリグリセリドを用いる場合には、AD82の流出速度に対して、たとえ影響すると

脂質質に相当する量を0.46 mlの概算した遠心管中の0  $\mu$ モルのホスファチジルコリンリポソームと共にインキュベートして、分散物を形成せしめた。

いろいろな時点において、生ずる分散液を1.5600秒において2分間遠心分離したのち、上層液中に残存する蛍光の量を測定した。流出速度についてのこれらの測定からのデータを第16図にプロットする。AD82の流出速度は比較的急速であり且つミクロ貯蔵液組成物中におけるホスファチド酸の含有率によつて本質的に影響を受けないということがわかる。

ミクロ貯蔵液からのAD82の流出速度は比較的急速であるけれども、ミクロ貯蔵液の使用は、現在用いられている投与形態と比較して、この薬剤の血液動力学的著しく有利な改良を生じさせる。これを実施例11と第17図に示す。

# 実施例 11

実施例9の成分5~18を、2.8mg/kgのAD88血症にまで、限外不飽和によつて融解した。1.5mg/kgの投与水準を与えるために充分な量のミクロ貯蔵器中のAD88を、150Pのわずかに付着状態に射し、且つ容量で1:1のエタノール/エマルホール(emulphor)の混合物中に溶解したAD88の臨床用配合物を、同じ投与水準で、8匹の対照わずかに同様に注射した。異なる時点で血液の試料を採取して、これらの血液試料中のAD88血症を蛍光によつて測定した。得たるデータ(各時点に対して8匹のわずかの平均)を、最初の注射からの時間の関数としてのAD88の含量として、第13図にプロットする。

第13図は、AD88をミクロ貯蔵器中に編入せしめたと共に、血液中におけるその薬剤の水準は、臨床用の目標として導入した濃度のAD88

かねずみを使用し且つ異なる4投与水準、7.5mg/kg、4mg/kg、2mg/kgおよび1mg/kgを使用した。これらの試料から得たデータを、時間の関数としての生存率として、第18図にプロットする。何れの場合においても、AD88を含有するミクロ貯蔵器を注射したはつかねずみは、対照のはつかねずみよりも高い生存率を示した。その上、1mg/kgというきわめて低い投与水準に於いてすら、接種するミクロ貯蔵器によつて過剰せしめたAD88は化学療法効果と異なり且つP888白血球細胞を与えたはつかねずみの生存の顕著な増大をもたらした。

アドリアマイシンの場合に於けると同様に、AD88の同一の血液濃度を、臨床用配合物に於けるよりも低いミクロ貯蔵器により過剰せしめたAD88の初期濃度において、達成することができ。その上、ミクロ貯蔵器組成物は、現在AD

特開昭55-13260(18)

に於けるよりも、あらゆる時点において常に、2~8倍も高いというように、本発明のミクロ貯蔵器の使用によつて達成されるAD88の血液動力学的な新しい改善を示している。薬剤が、より長時間にわたつて腫瘍細胞を追い求めることを可能とすることによつて、その血液動力学的に於けるこの改善は、化学療法剤としてのその有効性を向上させる。それを実施例12と第16図に示す。

# 実施例 12

AD88を含有する小胞状のミクロ貯蔵器を実施例9に於けるように配合し且つ3.9mgAD88/kgまで融解する。多数のはつかねずみに1x10<sup>6</sup>のP888細胞(白血球)細胞を腹腔内注射した。24時間後に、AD88を有する小胞状のミクロ貯蔵器および対照細胞の1日1回の腹腔内投与を、腫瘍移植後5日間の期間にわたつて、注射により行なつた。各病期に対して5匹のはつ

88の治療用配合物において必要とするエタノールと界面活性剤から成る混合溶液よりも血液との適合性が高い。

アドリアマイシンおよびAD88、ならびにカルミノマイシン(carminomycin)は、一般にアントラサイクリン薬剤の部類に属する癌の化学療法剤である。先行する実施例は、この部類の化学療法剤の薬力学を有利に改善することにおける本発明の過剰濃度の有効性を例証する。本発明のミクロ貯蔵器は、たとえエトロン試薬および代謝産物を包含する、他の部類の化学療法剤の送達のためにも適用することができる。

イミドカルブ(imidocarb)は、血液中の寄生虫を撲滅することによる動物中のアナプラズマの治療に於ける寄生虫撲滅剤として、きわめて有効であることが認められている。しかしながら、そのもつとも効果的な投与水準において投与すると

きは、集荷のイミドカルブが筋肉の組織中に残留する傾向があり、その動物を人の消費に用いようとする場合には、望ましくない事情となる。それ故、イミドカルブを循環血液系中に移行することができ、動物組織中に蓄積することなく、その治療効果を発揮させる迅速な形成の取得が望まれている。

イミドカルブおよびその塩液は、脱水性または脱水性/脱水性薬剤からそれらを区別する特性（ある脱水性を有する化合物である。しかしながら、下記実験例18および14ならびに表19〜21図からわかるように、ミクロ貯蔵液はたとえイミドカルブのような脱水性薬剤の薬力性を付与に改良するためにも、同様に効果的である。

#### 実験例 18

500 μモルの卵黄ホスファチジルコリン、

これらの分析結果は、第8図にかけると同様に、重ね合わせてある。小量状ミクロ貯蔵液の量は約200 Å〜300 Åで与えられることが認められた。

ミクロ貯蔵液の成分の抽出結果は、成分5乃至9では一致することを認めることができ、イミドカルブがミクロ貯蔵液と適合していることを示している。

本実験の透過電泳装置の使用によつて達成されるイミドカルブの血液動力学的有利な変換を、表21と第29および21図に示す。

#### 実験例 14

卵黄から誘導した100 μモルのホスファチジルコリンと10 μモルのホスファチド酸、10 μモルのコレステリルオレエートおよび2 μモルの<sup>14</sup>C-標識付けイミドカルブをクロロホルム中に溶解し、その溶液を真空下に減圧乾燥した。生成する混合成物を5 mlの0.15 M NaClと10 mMの

#### 実験例 55-13260 (8)

100 μモルの<sup>3</sup>H-標識付けコレステリルオレエート（比放射能  $1.0 \times 10^6$  dpm/μモル）および0.15 μモルの<sup>14</sup>C-標識付けイミドカルブをクロロホルム中に溶解し、その溶液を真空下に減圧乾燥した。生成する乾燥した物質/薬剤混合物を、45 mlの0.15 M NaClと290 mMのトリヒドロキシメチルアミン（pH 8.0）の添加によつて水和した。次いでその液を溶媒蒸留瓶Fに51℃で15分間超音波処理した。

次いで超音波処理を25×40 cmのセファロース4Bカラム上でクロマトグラフィーにかけた。クロマトグラフィーによつて生ずる個々の成分を、ホスファチジルコリンとホスファチド酸についてゴモリの方角により、また<sup>3</sup>H-コレステリルオレエートと<sup>14</sup>C-イミドカルブについて放射能により、それぞれ分析した。これらの分析の結果を成分番号の関数として第19図にプロットするが、

トリヒドロキシメチルアミン（pH 8.0）中に溶解させ、蒸気浴下で15℃で15分間超音波処理した。次いでこの液を25×40 cmのセファロース4Bカラム上でクロマトグラフィーにかけ、<sup>14</sup>C-標識付けイミドカルブ、卵黄およびコレステリルオレエートとの一致を示す成分を集めて、膜外析出によつて100 Åのイミドカルブという成分に減圧で濃縮した。0.15 M NaClおよび10 mMのトリヒドロキシメチルアミン（pH 8.0）中に溶かして、0.5 μg/mlの量の濃度のイミドカルブの溶液を、乾燥イミドカルブ投与に用いるための対照として、調製した。

イミドカルブ含有ミクロ貯蔵液と乾燥イミドカルブを、2投与量で、すなわち、0.5 μg/μと0.4 μg/μに、溶かして、必ずみの尾の血管中に注射した。血液試料を様々な時点において採取して、

放射能の測定によつて、これらの試料中のイミドカルブの量を定量した。時間の経過としてイミドカルブの含量としてプロットしたこれらの測定の結果を、第20および21図に示す。

生存する哺乳類宿主の血液中でイミドカルブを運搬するための循環するミクロ貯蔵器の使用による運搬能力の有利な改変は、第20および21図により明白である。たとえば、5g/100の投与量水準において、血液中のミクロ貯蔵器/イミドカルブ中のイミドカルブの濃度は、4時間後に、遠隔のイミドカルブに比べはるかに約140倍も高く、且つ4.4g/100の投与量水準においてはこの同じ時点において約200倍も高い。その上、第21図に示められるように、24時間後には、遠隔のイミドカルブにおいては血液中ではほとんど消失するのに対して、ミクロ貯蔵器/イミドカルブ形態では、なお測定可能な量のイミドカルブが血液中に含まれている。

が血液中に含まれている。

時間の経過としてのミクロ貯蔵器に対するイミドカルブの比をも、各投与量水準に対して、第20および21図中にプロットする。これらのプロットは所定の条件の測定に対して、明確に且つ予め決めることができる速度で薬剤が放出されることを明確に示している。第20および21図から、所望するならば、薬剤の投与量水準を、動物中にアナプラズマを生じさせる血液中に存在する寄生虫の濃度において有効であると発生考えられている水準よりも遙かに低くまで低下させることが可能であるということもまた明らかである。

異種生物質の薬力学を有利に改変することの主要な目標の一つは、異種生物質の組織分布を変化させるべき能力がある。これは本発明のミクロ貯蔵器を用いてイミドカルブに対して達成できるということも、実施例15と第2表に示す。

# 実施例 15

実施例14において用いた動物を、遠隔イミドカルブまたはイミドカルブ含有ミクロ貯蔵器の注射の4時間後に、殺した。たとえば筋、脾臓、肝臓および腎臓のような、各組織の組織を動物から摘出した。これらの組織をナール炭酸ガス中で燃焼して、生成する $^{14}CO_2$ を捕集し且つ放射能を計数した。組織の1g当りのカウント数を測定し、その結果を第2表に示す。

第 2 表

遠隔イミドカルブとミクロ貯蔵器中のイミドカルブの組織分布

組 織	dpm/g. 組織		変 化 %
	イミドカルブ	ミクロ貯蔵器/ イミドカルブ	
筋 肉	2965	2511	-13
腎 臓	40184	69984	+49
脾 臓	9498	15899	+61
肝 臓	27059	39991	+41

血液中およびいくつかの器官内で異種生物質を保持すべき能力は、たとえばイミドカルブのような薬剤に対して特に重要である。かくして、ミクロ貯蔵器の使用により達成される筋肉組織中のイミドカルブの12%の低下は、人の消費のために使用するべき動物の密度に及ぼすの寄生虫抗殺剤の使用に対して重要である。その上、比較的大きな割合のアナプラズマ寄生生物を含有する器官である肝臓および脾臓における薬剤の比較的高い濃度は、イミドカルブの使用を有利にするもう一つの顕著な要因である。

本発明の送達形態によつて有利に改変することができる異種生物質の薬力学の中には、経口的吸収があり、その改変は、異種生物質に対して、胃腸管を迂回して効果的な循環のために血液中に入る能力を付与することによつて達成される。現今では、胃腸管を bypass し、またはきわめて限ら

れた場合のみ胃腸管を通して、血液中に異種生物質を投与するための、いくつかの手段を入手することができる。かかる方法の一つは、たとえ本発明的に水に不溶解性であるエストラジオールのウンデカン酸エステルを形成せしめ且つそれを油中に溶解せし、それをマイクロクリスタリン分散油へと形成せしめ、またたとえエタノールのような有機溶剤を用いて溶液とするというように、異種生物質の化学的修飾である。

エストラジオールウンデカン酸エステル(受播薬調剤として用いられる)の本発明によるマイクロ貯蔵器中への導入は、従および有機溶剤のような液体媒体の必要を減らすと同時に血液の中へのこの異種生物質の速かに好都合な放出を達成する。本発明のマイクロ貯蔵器中へのエストラジオールウンデカン酸エステルの導入を、図面図1と第2図に示す。

の能力を、図面図17、第28図および第8図において更に例証する。

#### 実施例 17

$^3H$ -標識付けエストラジオールウンデカン酸エステルを、卵黄ホスファチジルコリンと $^{14}C$ -標識付けコレステリルオレエートから成るマイクロ貯蔵器中に被覆せしめた。每個の $^3H$ -標識付けエストラジオールウンデカン酸エステルをエタノール中に溶解した。1.63 $\mu$ g/片の量を、9匹ずつの2匹のねずみに経口内に投与した。1, 4 および 24 時間後に、各組中の3匹のねずみを殺して血液を集めた。遠心分離により血液から血漿を分離し、0.5 ml の各血漿試料を、指体として1.6  $\mu$ モルの非標識付けエストラジオールとエストロンを含有する9.5 ml の  $CHCl_3/MeOH$  (容積比2/1) に加えた。生成する液を蒸留したのち、円板に塩水を加えて3相系とした。下層を蒸

#### 実施例 18

800  $\mu$ モルの卵黄ホスファチジルコリン、80  $\mu$ モルのコレステリルオレエートおよび6  $\mu$ モルの $^3H$ -標識付けエストラジオールウンデカン酸エステル(比放射能4.6  $\mu$ Ci/ $\mu$ モル)をベンゼン中に溶解し且つ溶液乾燥した。生成する乾燥混合物は0.5 ml の0.154 M NaClと5 ml のトリヒドロキシメチルアミンを加え、生ずる液を真空雰囲気下に置きて17 時間超音波処理した。この超音波処理した混合物を、次いでセフノーヌ48カラム上でクロマトグラフィーにかけることによつて、第28図の流出曲線を与えた。成分12〜30は、本発明の送達成形薬の生体内評価を行なうために用いる異種生物質含有小嚢状マイクロ貯蔵器を構成した。

エストラジオールウンデカン酸エステルの経口的吸収を増大させるための本発明のマイクロ貯蔵器

を乾燥し、次いで2.0 ml のメタノール中に再溶解した。0.2 ml のこの溶液の放射能を計数した。残りの1.8 ml を薄層クロマトグラフィープレート上にスポットして、ベンゼン/酢酸エチル(容積比3/2)で展開した。プレートを短時間ヨウ素蒸気暴露することによつて脂性ステロイドを染色させたのち、穏和な加熱によつてヨウ素蒸気を追い出した。エストラジオールとエストロンに相当するこれらのスポットを切り取つて、放射能を計数した。血液中の $^3H$ -エストラジオールウンデカン酸エステルの量を第28図にプロットする。小嚢状マイクロ貯蔵器は、エタノール対照溶液と比較するとき、最初の12時間の間に血液中の $^3H$ -標識付けエストラジオールウンデカン酸エステル当量の出現を増大させることがわかる。8時間後に、エストラジオールウンデカン酸エステル当量の量は対照液に対して低下した。

## 第 3 表

エストラジオールウンデカン酸エステル<sup>14</sup>C-標識付の経口投与の1時間後の血液中の<sup>3</sup>Hエストラジオールの<sup>3</sup>Hエストロンに對する比

配合物	エストラジオール/エストロン*
エタノール溶液として	1.14
ミクロ貯蔵器として	1.84

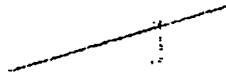
\* この比は8匹のねずみの平均にあつてゐる。

本発明のミクロ貯蔵送達系は、従来は経口的な投与方式が不可能であつた或種生物活性物質の経口的な投与の可能性を提供する。胃腸管を横切つてこのように薬品を運搬することによつて、それらを血液に間接的に送達せしめることを可能とし、かくして胃腸管中におけるそれらの代謝、および注射の必要、ならびにこの投与形態に付随する苦勞と煩瑣を排除することができる。

ミクロ貯蔵器は、小脳状形態または非小脳状形態あるいはこれらの形態の組合わせにおいて使用

エストラジオールは薬剤の活性形態であり、エストロンは不活性であることが知られている。その上、エストラジオールのエステル塩は、エストラジオールへと加水分解するまでは不活性であると推定される。それ故、血液中のエストラジオールのエストロンに對する比は、この薬剤の活性形態を増大させるべきミクロ貯蔵器の能力の指標となる。

上述の標識付エストラジオール塩の標識付クロマトグラフ分析の結果を第3表に示す。これらのデータから、エストラジオールのエストロンに對する比は、ミクロ貯蔵器を用いるときはエタノール溶液を用いるときよりも84%も高いことがわかる。



することができ、これを実施例18と第26および29図によつて例証する。

## 実施例 18

25 μモルの物質ホスファチルコリン、75 μモルの<sup>14</sup>C-標識付コレステリルオレエートおよび2 μモルの<sup>3</sup>H-標識付エストラジオールウンデカン酸エステルをクロロホルム中に溶解したのち、水相に固めた。脂質混合物を真空下に蒸気乾燥したのち、4.1 mlの0.15 M NaClと0.9 Mのトリヒドロキシメチルアミン(pH 7.2)によつて中和した。生成する液を減圧蒸留瓶下に40℃で20分間超音波処理したのち、セファロース4Bカラム中を脱下させた。生ずる抽出液を第24図に示す。エストラジオールウンデカン酸エステル、2、ミクロ貯蔵器の形態におけるエストラジオールウンデカン酸エステルのコレステリルオレエートに對する比は、ミクロ貯

蔵器の小脳状形態に對しては非小脳状形態に對するよりも高い親和性を有していることを認めることができる。カラムの空隙溶液中の物質は非小脳状形態から成つていたのに對して、内部溶液中の物質は小脳状形態から成つていた。

エストラジオールウンデカン酸エステルおよび約1 μモルの含有物質を含む非小脳状および小脳状形態の両者の試料を、2 μモルの超音波処理したホスファチルコリン分散物と共にインキュベートした。種々の時点において、試料を15,000 rpmで2分間遠心分離し、ミクロ貯蔵器を含有する上置液の放射能を測定した。コレステリルオレエートはこの系中で交換することができない種であるから、<sup>14</sup>C-標識付エストラジオールウンデカン酸エステルの<sup>14</sup>C-標識付コレステリルオレエートに對する比は、非小脳状または小脳状ミクロ貯蔵器からホスファチルコリン

分泌物へのエストラジオールウンデカン酸エステル  
の放出の速度の補正をとる。その結果を図35  
図に示す。エストラジオールウンデカン酸エステルは、ミクロ貯蔵器の両形膜に待たずて浸透する  
ことが認められ、両者共に其種生物質の透過および  
形成のために不十分であることを示している。

本発明の共種生物質含有ミクロ貯蔵器は、油々  
の成育形態へと配合することができる。かくして、  
たとえば、それらを生化学的に適合する液体中に  
分散させてもよいし、それらを乾燥して錠剤に成  
形せしめてもよいし、あるいはそれらを適当な生  
物活性の材料からなるカプセル中に含有せしめて  
もよい。

上記の詳細な説明と実施例から、本発明の透過  
成形成は広い範囲の化学的および物理的特性なら  
びに広い範囲の生物学的用途および性質を有する  
共種生物質の薬力学を有利に改良することが可能

であることがわかる。

かくして、上記の説明によつて明白となつた前  
記の目的は知覚的に達成され且つ、本発明の範囲  
から逸脱することなく、上記の方法の進行におい  
て且つ上記の組成物および製品において、いくつ  
かの変更を行なうことが可能であるから、上記説  
明に含まれまたは図面中に示されるあらゆる問題  
は、例として示したものであつて限定的な意味の  
ものではないということを了解すべきである。

#### （図面の簡単な説明）

第1図は本発明の共種生物質透過成形成を確認  
するための一方法を示す流れ工図図である。

第2図は第1図の方法の細節を示す部分の流れ  
工図図である。

第3図は小血管形態にある本発明のミクロ貯蔵  
器の著しく拡大した概念図である。

第4図は非小血管形態にある本発明のミクロ貯

蔵器の著しく拡大した概念図である。

第5図は従来の技術において明らかである形式  
の成形成透過成形成の著しく拡大した概念図である。

第6図は、時間の函数としてのミクロ貯蔵器お  
よびリボゾームの、光学密度により測定した、ミ  
クロ貯蔵器とリボゾームの試験管内安定性の比較  
を示す。

第7図は、時間の函数としての血液中に残存す  
るコレステリルオレエート（コレステロールエス  
テル）の量としてプロットした、ミクロ貯蔵器の  
生体内安定性を示す。

第8図は、一連のクロマトグラフィー面分中の  
ホスファチジルコリン、コレステリルオレエート  
およびアドリアマイシン濃度としてプロットし  
た、アドリアマイシンを透過するミクロ貯蔵器の  
流出輪郭である。

第9図は、腫瘍の場所への送達のために血液中

に残存する薬剤の量が如何に速かであるかを示す、  
透過の時間の注射の直後のアドリアマイシンのよ  
うな薬剤の分布を示す概念図である。

第10図は、ミクロ貯蔵器中の薬剤として、お  
よび透過のアドリアマイシンとしての注射後の時  
間の函数としての血液中に残存するアドリアマイ  
シンの量のプロットの形態で例示する、適量する  
ミクロ貯蔵器がアドリアマイシンの血液薬力学を  
有利に改良しうる様子を示す。

第11図は、4投与量水準のミクロ貯蔵器、ミ  
クロ貯蔵器中のアドリアマイシンおよび透過形態  
のアドリアマイシンの注射後の時間の函数として  
の一連のばつかけの生存数の一連のプロット  
でもり、これらのプロットは、アドリアマイシン  
の毒性を低下させるべき送達成形成として前記  
ミクロ貯蔵器の能力を例証している。

第12図は、2投与量水準におけるミクロ貯蔵



腺中のアドリアマイシンの注射後の時間の経過としての、腎臓組織を注射した一群のはつかねずみの生存数の一連のプロットであり、これらのプロットはミクロ貯蔵器により送達せしめ且つそれから解放せしめアドリアマイシンの化学療法を有利な変化を例証している。

第13図は、腎臓内不混和性成分としてのグリセリントリオレエートおよび脂肪酸エステルとして、種々の種のコレステロールを含有する組織物から成るミクロ貯蔵器からの時間の経過としてのアドリアマイシンの流出速度の一連のプロットである。

第14図は、脂質質不混和性成分としてコレステリルオレエートを、脂肪酸エステルとして種々の種のコレステロールを含有する組織物から成るミクロ貯蔵器からの、時間の経過としての、アドリアマイシンの流出速度の一連のプロットである。

第15図は一連のクロマトグラフィー面分中の抽出液、コレステリルオレエートおよびイミドカルブ誘導体としてプロットしたイミドカルブ誘導体ミクロ貯蔵器の抽出輸送である。

第20および21図は、飼育するミクロ貯蔵器が、2週間毎に水浴におけるイミドカルブの血漿動力学を有利に改変することができる程度を例証するものであり、これらの例証は、ミクロ貯蔵器中のおよび5週毎にイミドカルブとしての薬剤の注射後の時間の経過としての血漿中に検出するイミドカルブの値およびイミドカルブのミクロ貯蔵器に対する比のプロットの形跡にある。

第22図は一連のクロマトグラフィー面分中のホスファチジルコリンおよびエストラジオールウンデカン酸エステル誘導体としてプロットしたエストラジオールウンデカン酸エステルを運搬するミクロ貯蔵器の抽出輸送である。

特開55-132602A  
第15図は、一連のクロマトグラフィー面分中の抽出液、コレステリルオレエートおよびAD82誘導体としてプロットしたAD82を運搬するミクロ貯蔵器の抽出輸送である。

第16図は、ミクロ貯蔵器抽出物の抽出液成分中に与える少量のホスファチジルコリンの使用の効果を示す、小腸状ミクロ貯蔵器からのAD82の抽出速度のプロットである。

第17図は、飼育するミクロ貯蔵器がAD82の血漿動力学を有利に改変することができる程度を示している。

第18図はミクロ貯蔵器中のAD82の4投与水準における注射後の時間の経過としての運搬組織を有する一群のはつかねずみの生存数の一連のプロットであり、これらのプロットはミクロ貯蔵器によつて送達せしめるAD82の化学療法例としての能力を示す。

第23図はエタノール溶液としておよびミクロ貯蔵器中で能動的に投与したエストラジオールウンデカン酸エステルの8時間における血漿中の濃度を示すグラフである。

第24図はエストラジオールウンデカン酸エステルを運搬する小腸状および非小腸状ミクロ貯蔵器の抽出輸送である。

第25図は小腸状および非小腸状ミクロ貯蔵器からのエストラジオールウンデカン酸エステルの流出速度のプロットである。

特許出願人 アーサー・デイ・リトル・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平 吉

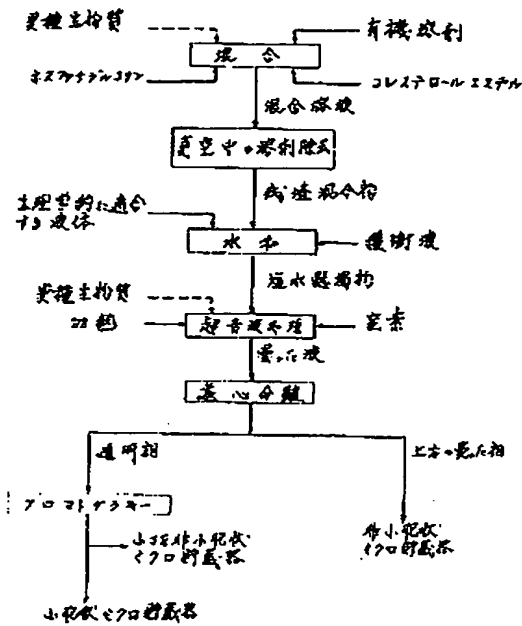


Fig. 1

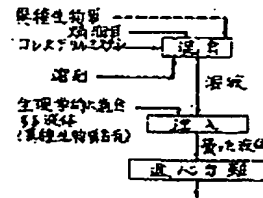


Fig. 2

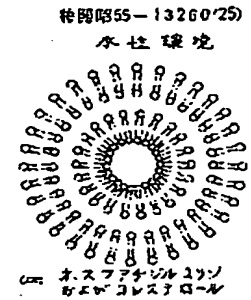


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

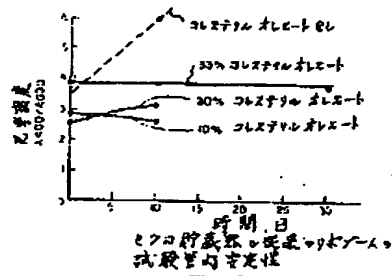


Fig. 6

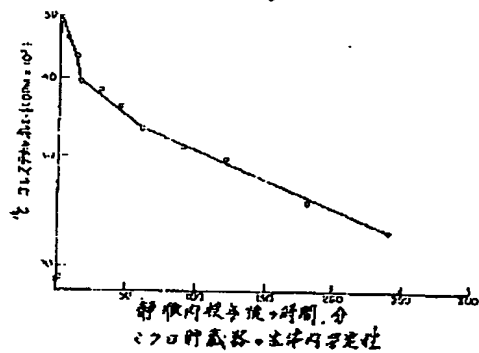


Fig. 7

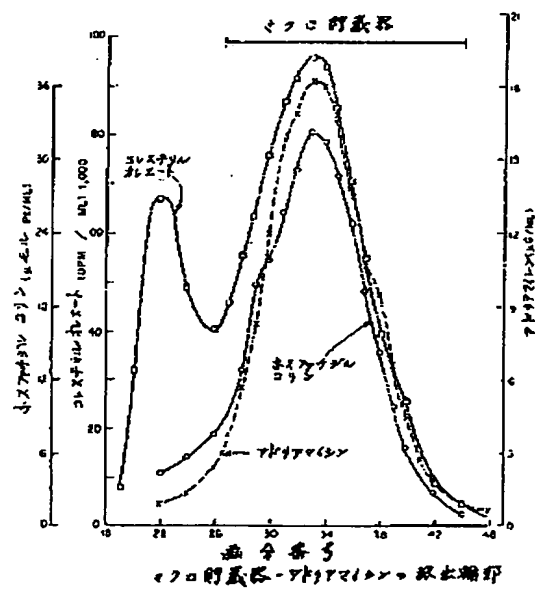
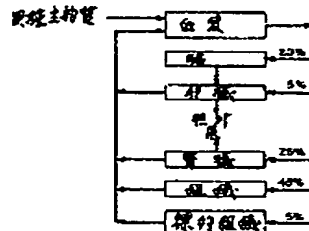
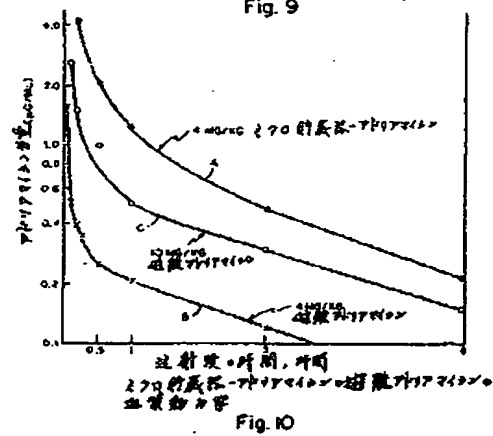


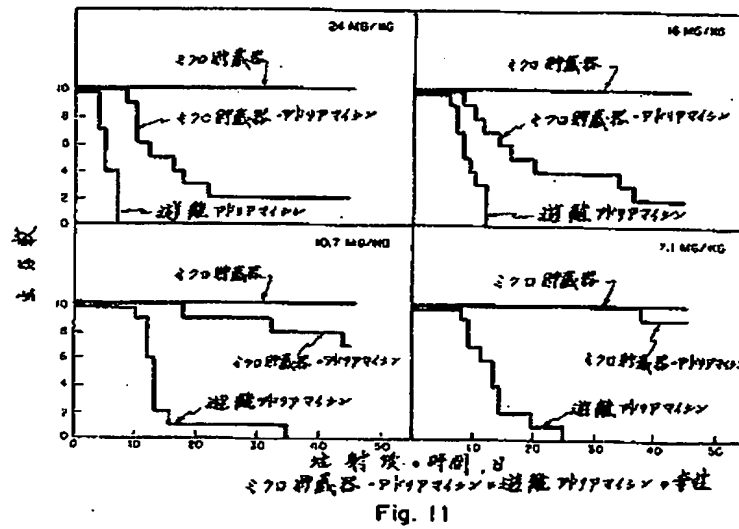
Fig. 8



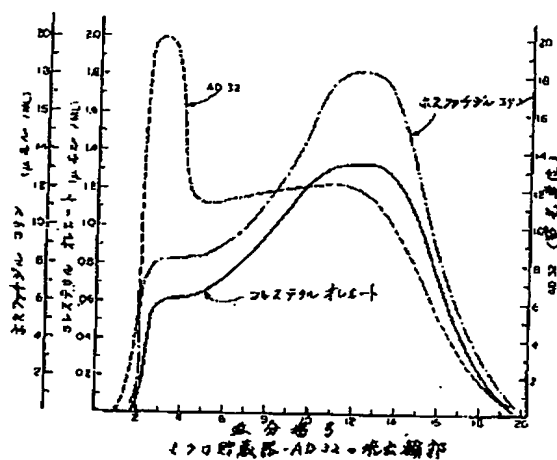
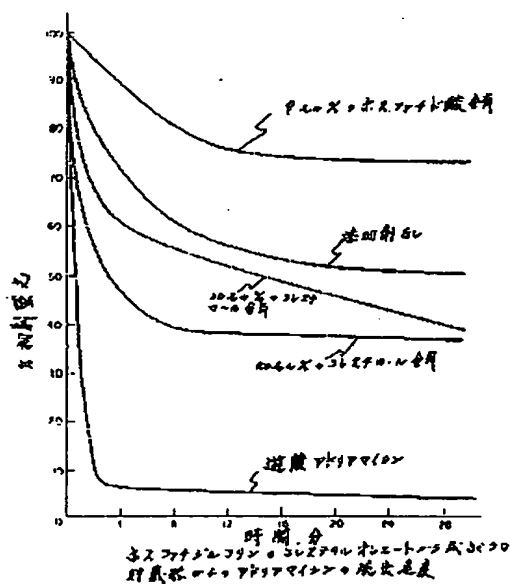
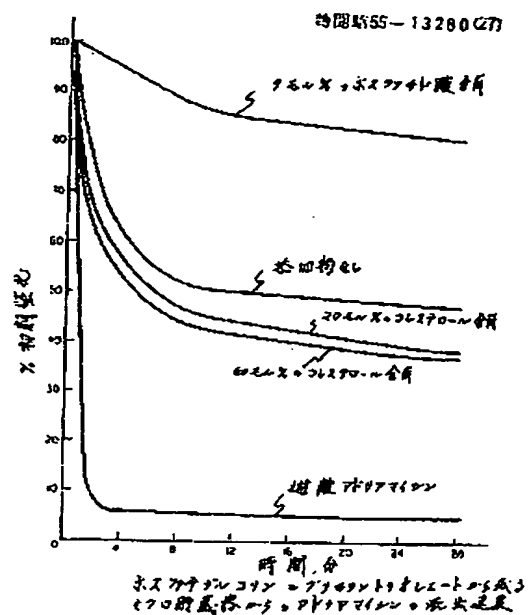
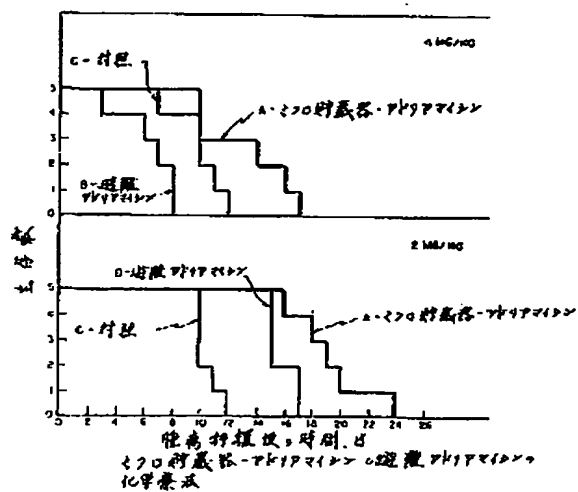
**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**



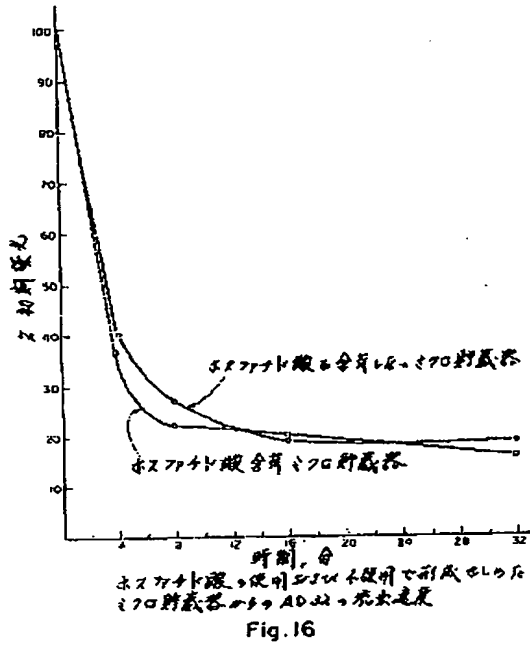


Fig. 16

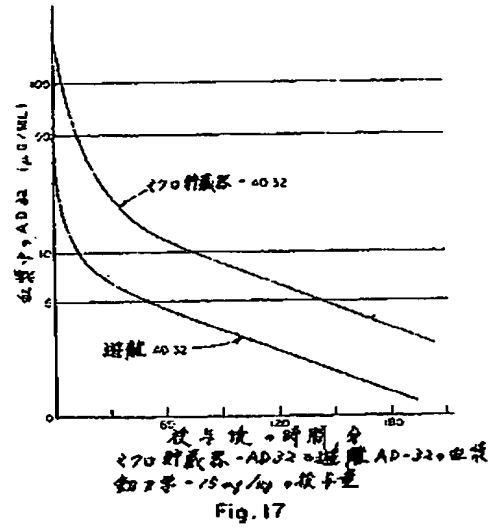


Fig. 17

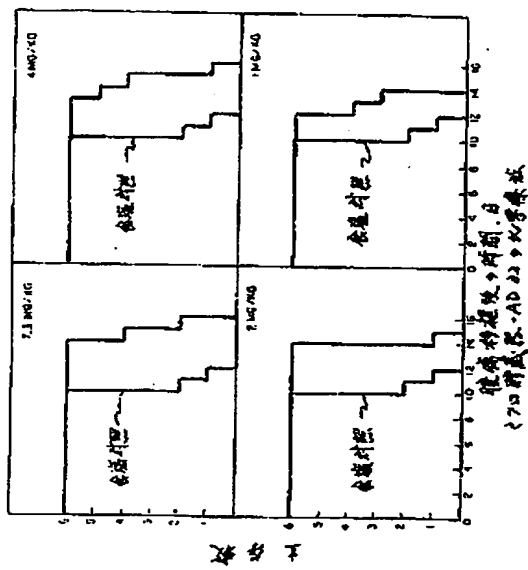


Fig. 18

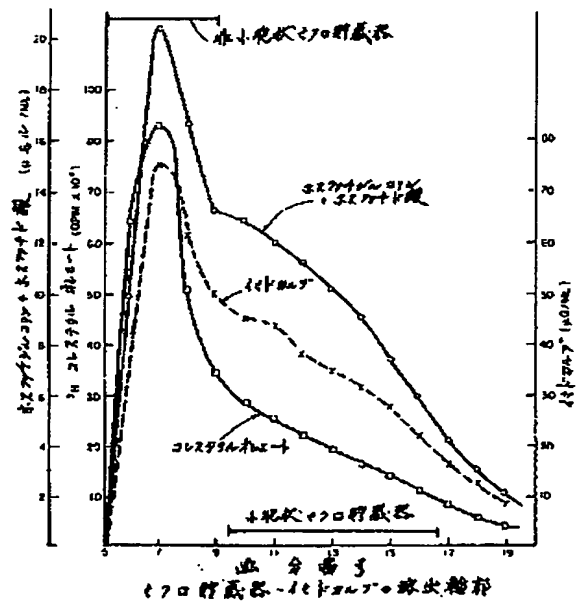
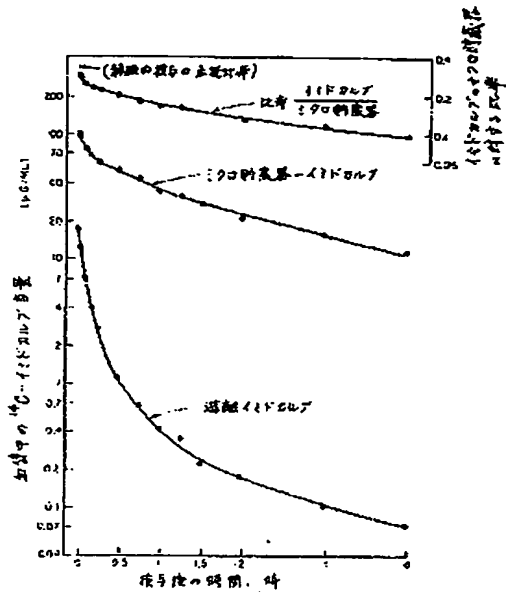
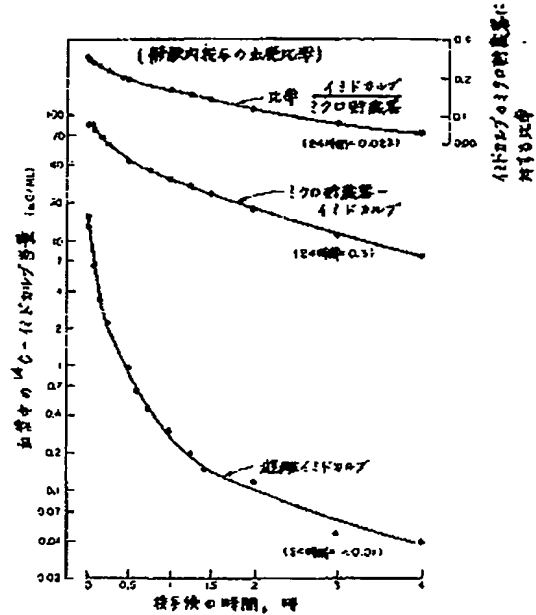


Fig. 19



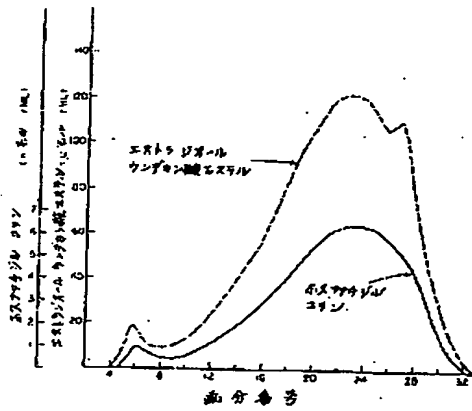
クロル孕素-イソドロル孕素と遊離イソドロル孕素の血中濃度を5mg/kgの投与量

Fig. 20



クロル孕素-イソドロル孕素と遊離イソドロル孕素の血中濃度を4.4mg/kgの投与量

Fig. 21



クロル孕素-エストロゲン-エストロン濃度と血中濃度

Fig. 22

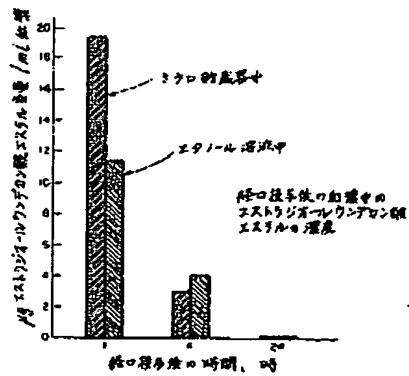
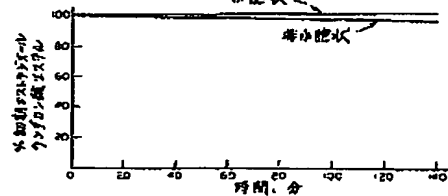
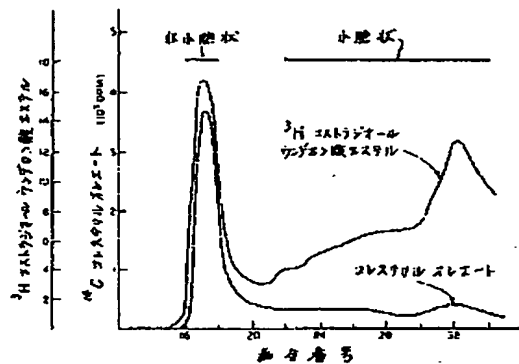


Fig. 23



エストロゲンとエストロン濃度のクロル孕素からのエストロゲン-エストロン濃度

Fig. 25



小腸液及び小腸液の消化液-エストロゲン  
 プログステロンの分離  
 Fig. 24

特許第55-13266:30  
 手続補正審(方式)

昭和54年8月30日

特許庁長官 川島隆雄 殿

1. 本件の特許  
 昭和54年特許第55-13266号
2. 補正の名称  
 長生動物細胞培養液、その製造方法及び用途
3. 補正をする者  
 事件との関係 特許出願人  
 氏名 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02140・  
 ケンブリッジ・アコースティック・コーポレーション  
 名称 アーサー・ディー・リトル・インコーポレー  
 (氏名) テッド
4. 代理人 平 107  
 住所 東京都港区赤坂1丁目8番15号  
 日本内閣事務所  
 氏名 佐藤 幸子 小田 島 平 貞
5. 補正の年月日 昭和54年7月31日(発送日)
6. 補正の対象  
 図面(第1、2、3図以外の全図)及び明細書の「特許の  
 範囲を説明」の項
7. 補正の内容  
 明細書の修正。  
 (特許庁 54.8.30)

- (1) 明細書第87頁下から2行に、「概念図である。」とある後に、「図中、(A)はホスファチジルコリンを、(B)はコレステロールエステルを示し、(C)は水性環境を示す。」と加入する。
- (2) 明細書第88頁1行に、「概念図である。」とある後に、「図中、(A)、(B)及び(C)は上記したと同じである。」と加入する。
- (3) 明細書第89頁3行に、「概念図である。」とある後に、「図中、(A')はホスファチジルコリンおよびコレステロールを示し、(C)は上記したと同じである。」と加入する。
- (4) 明細書第90頁7行に、「示す。」とある後に、「図中、縦線は100%コレステリルオレエート、斜線は50%コレステリルオレエート、点線は25%コレステリルオレエート、空白はコレステリルオレエートなしの場合を示す。」と加入する。

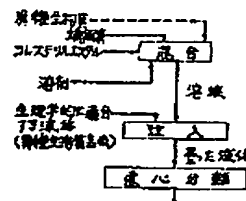


Fig. 2

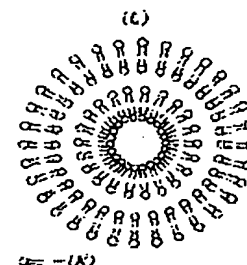


Fig. 5

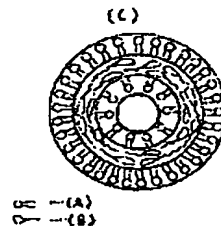


Fig. 3



Fig. 4

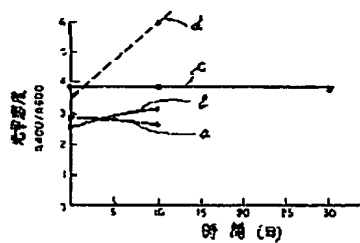


Fig. 6

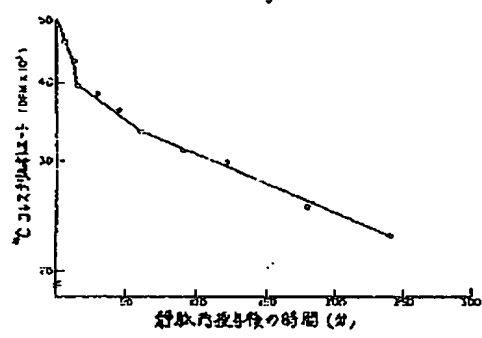


Fig. 7

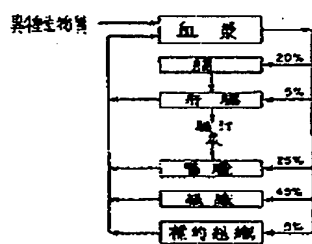


Fig. 9

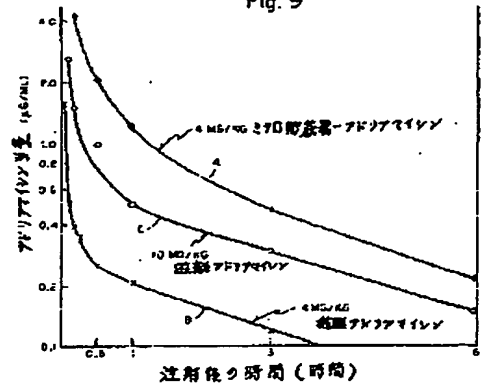


Fig. 10

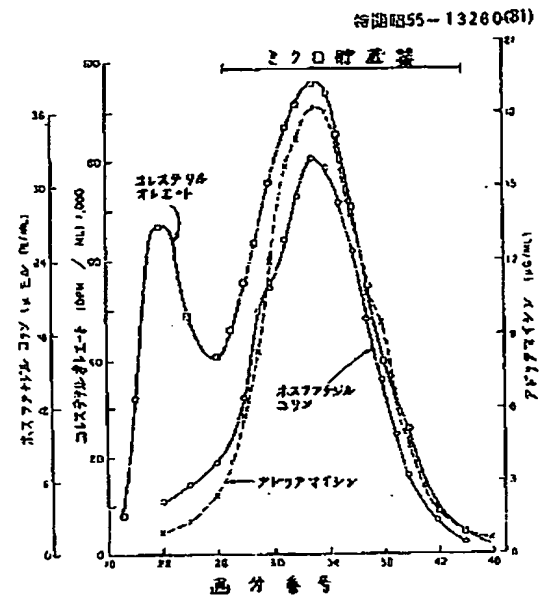


Fig. 8

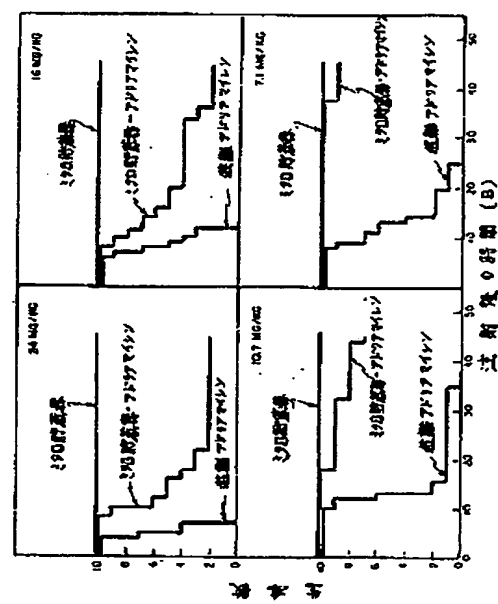


Fig. 11



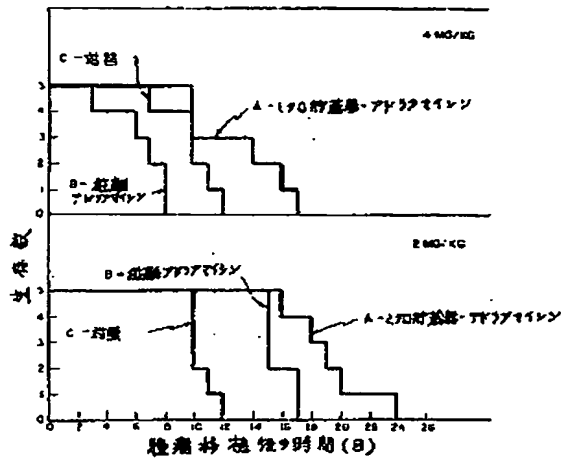


Fig. 12

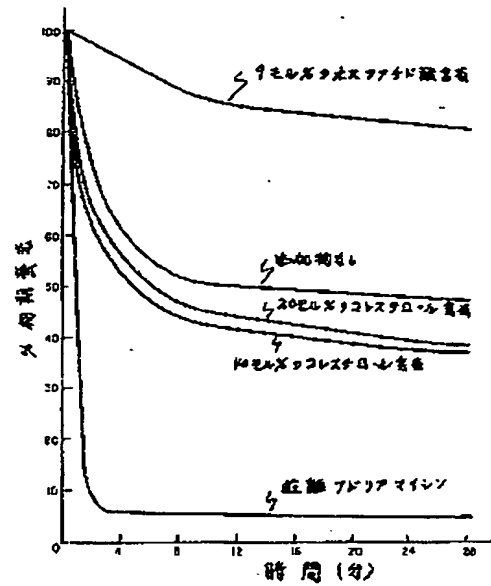


Fig. 13

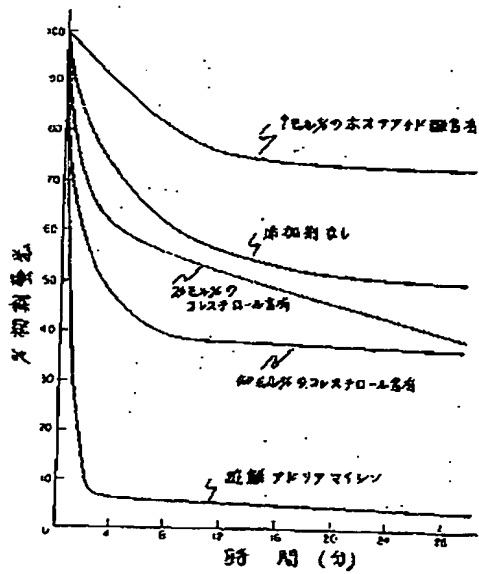


Fig. 14

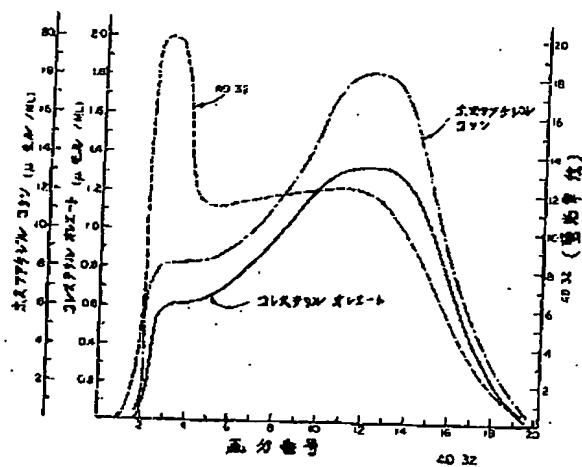


Fig. 15

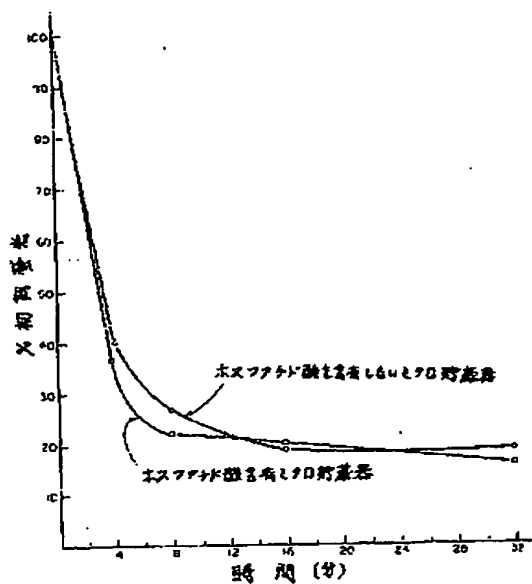


Fig. 16

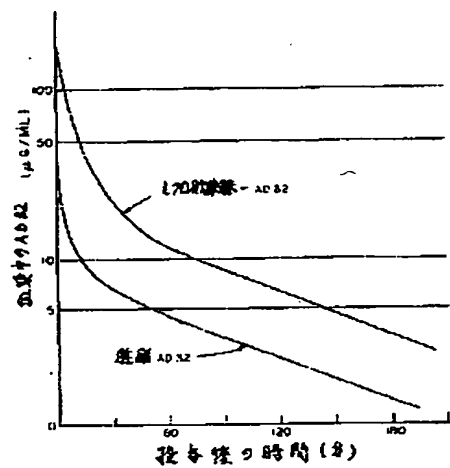


Fig. 17

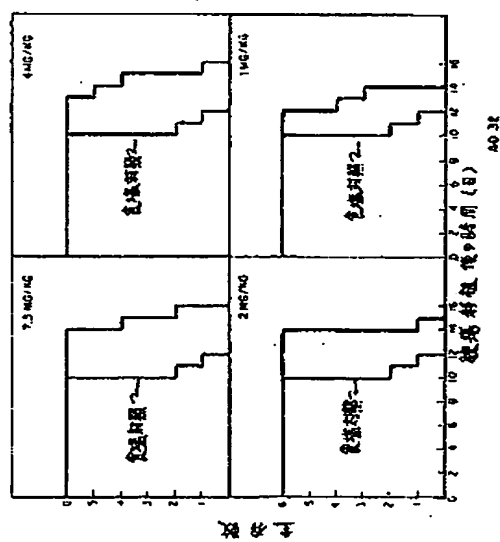


Fig. 18

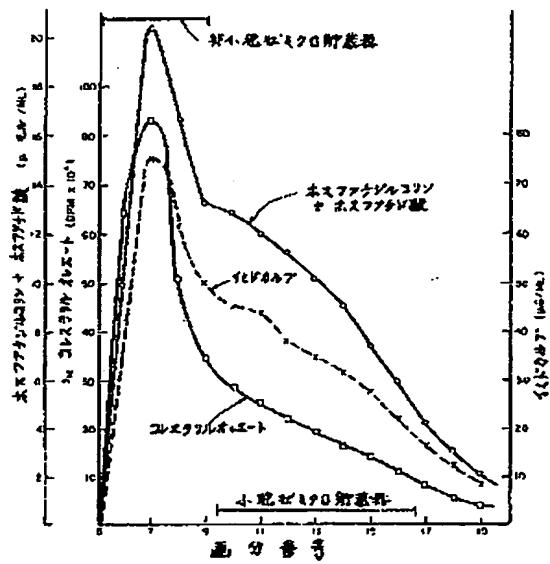


Fig. 19

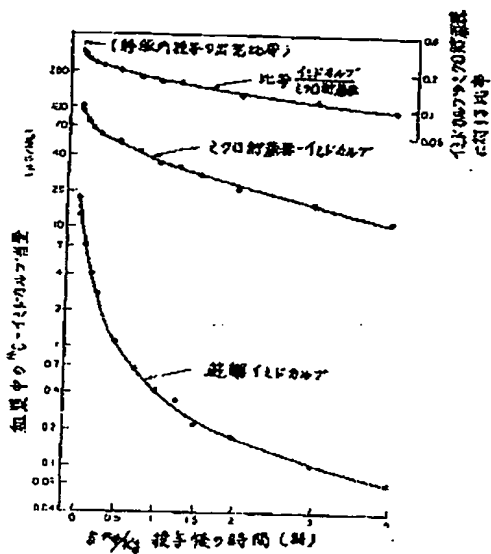


Fig. 20

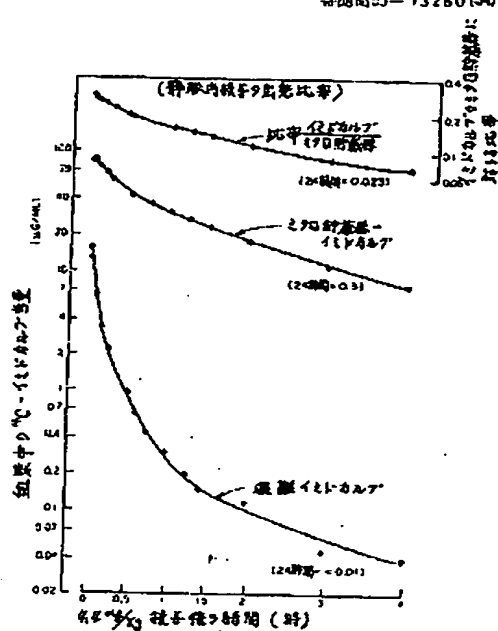


Fig. 21

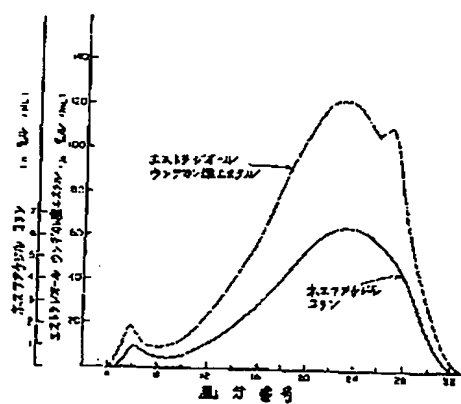


Fig. 22

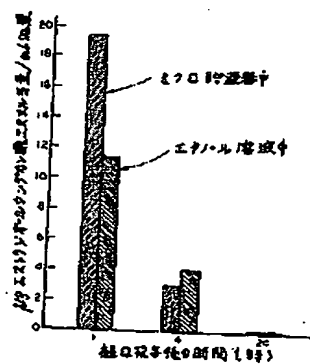


Fig. 23

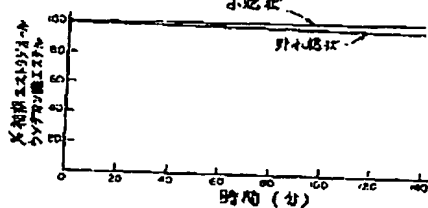


Fig. 25

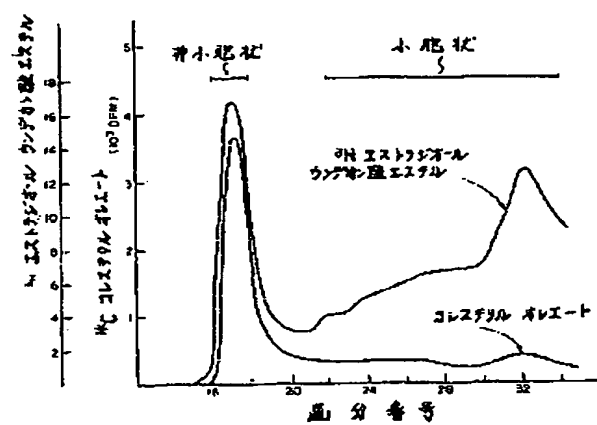


Fig. 24

昭 55 3.31

特許法第17条の2による補正の掲載  
昭和 54年特許昭和 44477 号(特開昭  
65-13260 号 昭和 55年 1月 30日  
発行公開特許公報 55-133 号掲載)につ  
いては特許法第17条の2による補正があったので  
下記のとおり掲載する。

Int.Cl.	出願 記録	庁内整理番号
A61K 9/10 9/60		7057 4C 7057 4C

# 手 続 補 正 書

昭和 54 年 12 月 11 日

特許庁長官 川 原 正 雄 殿

1. 事件の表示  
特開昭 54-44477 号

2. 発明の名称  
異性体の両送系成形体、その生成法及び利用法

3. 改正をする事  
本件との関係 特許出願人  
在 所 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02140・  
ケンブリッジ・アコースティック 2 号  
名 称 アーサー・ディー・リトル・インコーポ  
(氏 名) レーテッド

4. 代理人 千 167  
在 所 東京都港区赤坂 1-10-15 番地  
日 本 特 許 法 理 事 会 会 社  
氏 名 207 特許士 小 田 島 孝 吉

5. 補正命令の日付 昭和 54 年 12 月 11 日(特開昭 54-44477 号)

6. 補正の理由 明細書の「有機溶媒の組成」、「溶剤の種類及び量」、「  
」と前記の請求項を改訂し、特許請求の範囲中「5.014」を「5.015」に改訂する。

7. 補正の内容  
54.12.11  
特開昭 54-44477 号

【1】 明細書の「特許請求の範囲」の欄の記載を、以下のとおり訂正する。なお、訂正は第1項を削除するもので、他の項に訂正箇所はありません。

「1. 異性生物質を含有するクロロ酢酸の形態であり、該クロロ酢酸は塩酸置換成分および生化学的に適合する媒体中で安定であり且つそれと本質的に不混和性である有機質-不混和性脂質成分から成ることを特徴とする、その使用によつて薬力等を有利に改定せしめる該異性生物質を哺乳動物体内に迅速および解放せしめるための、該物質と生体適合性ある送達試形態。

2. 該クロロ酢酸は約100Å乃至約300Åの径の空隙を有する小胞状形態にあるか、約250Å乃至1000Åの径の空隙を有する非小胞状形態にあるか、又は非小胞状および小胞状の両形態にある、特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

送達試形態。

3. 該クロロ酢酸は約50モル%乃至約97モル%の酸置換成分を含有する、特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

4. 該クロロ酢酸は異性生物質と合調剤または異性生物質と改定剤とを包含する、特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

5. 該酸置換成分はホスファチジルコリンを含有して成り且つ少なくとも約5モル%に相当する量でホスファチド酸を含有してもよい、特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

6. 該酸置換成分は不混和性脂質成分は10〜18炭素原子を有する脂肪族のコレステロールエステル又はトリグリセライドより成る、特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

7. 該異性生物質は生化学療法剤、癌生体療法剤、又は受容体調節剤の如き薬用である特許請求の範囲第1項記載の送達試形態。

昭 55 3.31

8. 該異種生物質はその血漿動力学特性、化学的安定性、又はその腸口吸収を有利に改変される薬剤である、特許請求の範囲第1項記載の過程で形成。

9. 液相成分と生理学内に適合する液体中で安定であり且つ本質的にそれと不混和性である脂質不混和性脂質成分とから成る組成物のミクロ貯蔵器を形成せしめ；且つ送達せしめるべき該異種生物質を該ミクロ貯蔵器内に導入せしめる段階から成ることを特徴とする、特許請求の範囲第1項記載の液相成分の形成方法。

10. 該ミクロ貯蔵器を形成せしめるための特徴は、

(a) 透明を用いて液相成分及び液相脂質不混和性脂質成分の存在を生じせしめ；

(b) 該等利を除去することによつて液相成分と液相脂質不混和性脂質成分の乾燥状態を

物を生じしめ；

(c) 該乾燥状態を生理学的に適合する液体を用いて水和せしめることによつて液相成分を形成せしめ；

(d) 該液相成分を非酸化性雰囲気下に少なくとも該液相成分不混和性脂質成分の組成に等しい組成物において超微粒化することによつて該ミクロ貯蔵器を生じせしめ；且つ

(e) かくして形成せしめた該ミクロ貯蔵器を分離する。

ことから成る、特許請求の範囲第9項記載の方法。

11. 該ミクロ貯蔵器内に該異種生物質を導入せしめるための該段階は該異種生物質を液相成分において該液体に添加するか、該液体を液相成分に添加することから成る、特許請求の範囲第10項記載の方法。

12. かくして形成せしめた該ミクロ貯蔵器を

- 4 -

分離するための該段階は、超微粒化した液相成分を互心分離し且つ該互心分離により生ずる透明相をクロマトグラフィーにかけることによつて一連のクロマトグラフィー成分を得、そして場合に依り約100Å乃至800Åの範囲の直径を有する小粒状形態にある該ミクロ貯蔵器を含有する該クロマトグラフィー成分を、約250Å乃至約1000Åの範囲の直径を有する非小粒状形態にある該ミクロ貯蔵器を含有する成分から分離する段階を含むに包含する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

13. 該特許請求の範囲第10項記載の方法又は該異種生物質解放促進剤を添加する段階を包含する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

14. 該生理学的に適合性液体中に該異種生物質を含有する該ミクロ貯蔵器を播種させ、それにより液体型と形態の該異種生物質を得るか、又は生理学的に許容し得る材料から形成されたカプセル

中に該異種生物質を含有する該ミクロ貯蔵器をカプセル被覆する工程を含む特許請求の範囲第9項記載の方法。

【Ⅱ】 明細書の「透明の液相成分」の項の記載を以下のとおり訂正する。

(1) 明細書第2頁下から3～4行、同第3頁1行、同第4頁6行、同第5頁5～6行、同第6頁下から3～2行、同第7頁1行、同第8頁2～8行及び同第8頁10行に、夫々、「アドリブマイシン」とあるを、

「ドクノマイシン」

と訂正する。

(2) 明細書第9頁10～11行に、「効果の大きい……考えられているが、」とあるを、「該の化学療法剤として臨床的に評価されているが、」

と訂正する。

- 7 -

- 8 -

(72)

(3) 明細書 40 頁 1 行に、「アドリアマイシン」とあるを、

『代表的なアントラサイクリン系剤』と訂正する。

(4) 明細書 40 頁 2～8 行、同 40 頁 9 行、同 40 頁 下から 3 行、同 41 頁 4～5 行、同 41 頁 7～8 行、同 41 頁 8 行、同 41 頁 10～11 行、同 41 頁 12 行、同 41 頁 14 行、同 41 頁 15 行、同 41 頁 16 行、同 42 頁 4～5 行、同 42 頁 8 行、同 42 頁 18 行、同 42 頁 19 行、同 43 頁 1 行、同 43 頁 4 行、同 43 頁 下から 3 行、同 44 頁 6 行、同 44 頁 18 行、同 45 頁 下から 4 行、同 45 頁 9 行、同 46 頁 10～11 行、同 46 頁 18～14 行、同 46 頁 15 行、同 47 頁 1～8 行、同 47 頁 2 行、同 47 頁 4 行、同 47 頁 11 行、同 47 頁 18 行、同 47 頁 15 行、同 49 頁 8 行、同 48 頁 5 行、同 48 頁 10 行、同

48 頁 18～19 行、同 48 頁 15 行、同 48 頁 22 行、同 49 頁 8 行、同 49 頁 13 行、同 49 頁 末行～50 頁 1 行、同 51 頁 8 行、同 52 頁 9 行、同 53 頁 11～12 行、同 58 頁 18 行、同 58 頁 14 行、同 58 頁 16 行、同 54 頁 2 行及び同 54 頁 3 行に、次々、「アドリアマイシン」とあるを、

『ダウノマイシン』

と訂正する。

(5) 明細書 55 頁の第 1 表の第 1 行及び第 8 行に、次々、「アドリアマイシン」とあるを、

『ダウノマイシン』

と訂正する。

(6) 明細書 56 頁 3～9 行に、「アドリアマイシン……示唆する。」とあるを、

『ダウノマイシンの取り上げを増大させることがわかる。ホスファチド酸の混合が必要をイミド

- 8 -

カルブ（実用例 13～15）と異なつて、イオン化し得るアミン官能基を有するダウノマイシンは、核酸塩酸分の一部としてのホスファチド酸の使用の利点がある。斯くて、ホスファチド酸は各種の赤質の核酸塩酸に対して適用可能とみられる。」

と訂正する。

(7) 明細書 56 頁 11 行、同 57 頁 1 行、同 58 頁 8 行、同 59 頁 2 行、同 59 頁 4 行、同 59 頁 9～10 行、同 59 頁 12～13 行、同 60 頁 8 行、同 60 頁 下から 3 行、同 60 頁 下から 4 行及び同 61 頁 5～8 行に、次々、「アドリアマイシン」とあるを、

『ダウノマイシン』

と訂正する。

(8) 明細書 69 頁 4 行に、「アドリアマイシン」とあるを、

『ダウノマイシン』

と訂正する。

(9) 明細書 88 頁 下から 4 行、同 88 頁 下から 3 行、同 89 頁 5 行、同 89 頁 6～7 行、同 89 頁 8 行、同 89 頁 11 行、同 89 頁 18 行、同 89 頁 14 行、同 90 頁 1 行、同 90 頁 5 行、同 90 頁 11 行及び同 90 頁 下から 2～末行に、次々、「アドリアマイシン」とあるを、

『ダウノマイシン』

と訂正する。

(10) 明細書 89 頁 8～8 行に、「アドリアマイシンのような」とあるを、

『代表的なアントラサイクリン』

と訂正する。

(11) 明細書 18 頁 下から 4 行に、「ホスファチド酸」とあるを、

『phosphatidic acid』

昭 55 3.31

と加入する。

08 須知書第 87 頁の行に、「了解すべきである。」とある後に行をよめて、下記文章を加入する。

『本発明の異種生物資源選別形態を利用して、下記の方法を提供することができる。

禽類資源成分と生理学的に適合性の液体中で安定性であり且つこれと本質的に不飽和性である磷脂質・不飽和脂肪酸成分から形成されたミクロ分散液内に含有された異種生物資源の医薬的有効量を、確口投与、局所投与又は吸入投与又は静脈内、筋肉内、腹腔内又は皮下注入等によって哺乳動物中に導入する工程より成る哺乳動物体内に異種生物資源を迅速及び解放する方法。』

( 画 ) 添付図面中、Fig 8、Fig 10、Fig 11、Fig 12、Fig 13 及び Fig 14 を添付図面のとおり訂正する。

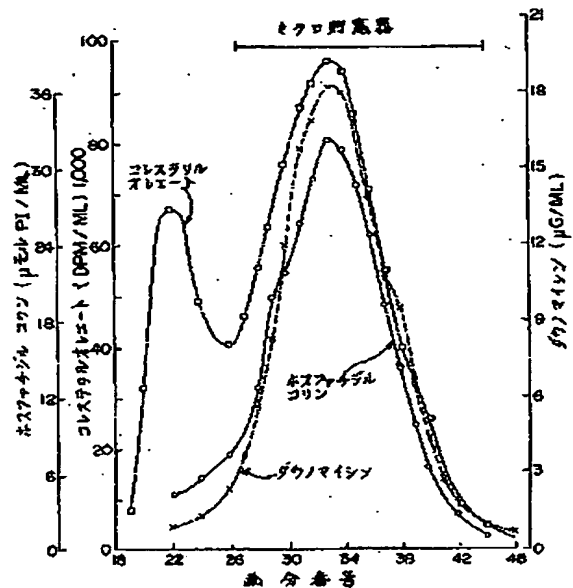


Fig. 8

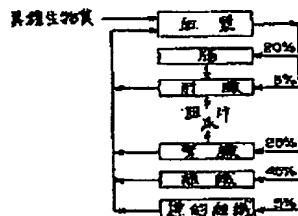


Fig. 9

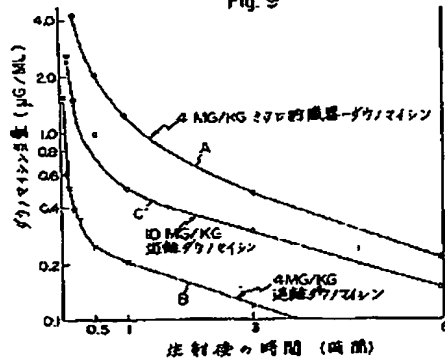


Fig 10

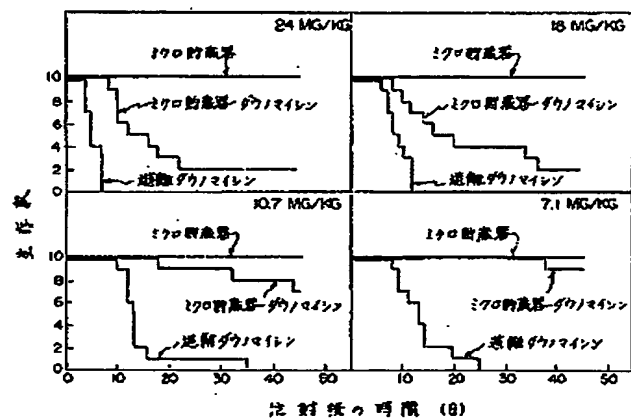


Fig. 11



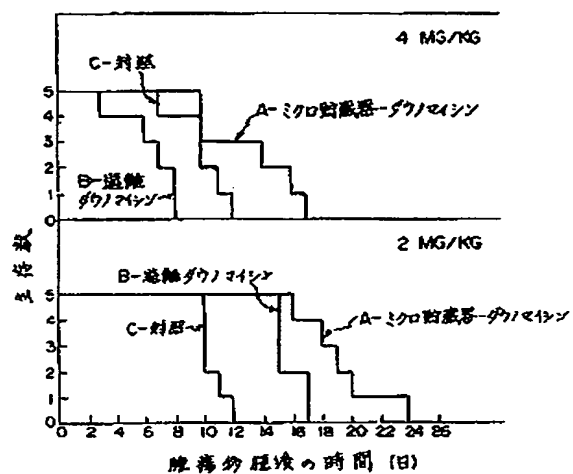


Fig. 12

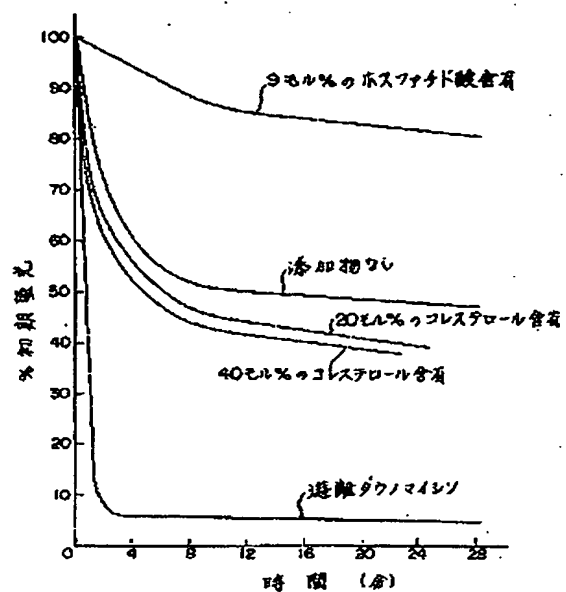


Fig. 13

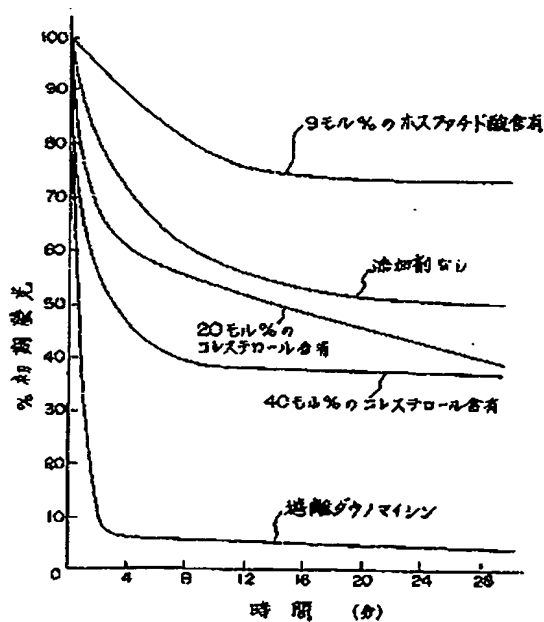


Fig. 14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**